

Aus der Klinik für Kieferorthopädie
(Direktor: Prof. Dr. Helge Fischer-Brandies)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**BIOKOMPATIBILITÄT VON KIEFERORTHOPÄDISCHEN MINISCHRAUBEN:
EINE IN-VITRO-STUDIE AN HUMANEN GINGIVAFIBROBLASTEN
UND DER ETABLIERTEN OSTEOLASTENZELLINIE SAOS-2**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
HANNAH FINKE
aus **Henstedt-Ulzburg**
Kiel **2012**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fischer-Brandies

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. S. Paris

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 27.11.2012

gez.: Prof. Dr. H.-J. Wenz

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Ziel der Studie | 7 |
| 2. | Material und Methoden | 8 |
| 2.1. | Kieferorthopädische Minischrauben | 8 |
| 2.2. | Rasterelektronenmikroskop / Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) | 9 |
| 2.3. | Zellkultur | 11 |
| 2.4. | Eluat-Herstellung | 13 |
| 2.5. | Quantitative Beurteilung der Zytotoxizität: MTT-Test | 14 |
| 2.6. | Qualitative Beurteilung der Zytotoxizität: Agar-Overlay-Test | 16 |
| 2.7. | Statistik | 18 |
| 3. | Ergebnisse | 19 |
| 3.1. | Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung | 19 |
| 3.2. | Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) | 24 |
| 3.3. | Quantitative Beurteilung der Zytotoxizität: MTT-Test | 28 |
| 3.3.1. | Direkter MTT-Test mit Fibroblasten | 28 |
| 3.3.2. | Direkter MTT-Test mit Osteoblasten | 29 |
| 3.3.3. | Indirekter MTT-Test mit Fibroblasten | 30 |
| 3.3.4. | Indirekter MTT-Test mit Osteoblasten | 31 |
| 3.4. | Qualitative Beurteilung der Zytotoxizität: Agar-Overlay-Test | 32 |
| 3.4.1. | Fibroblasten | 32 |
| 3.4.2. | Osteoblasten | 35 |
| 4. | Diskussion | 38 |
| 4.1. | Bisherige Forschung | 38 |
| 4.2. | Ergebnisse dieser Studie | 39 |
| 4.3. | Schlussfolgerungen | 45 |

| | | |
|-----|----------------------|----|
| 5. | Zusammenfassung | 46 |
| 6. | Summary | 48 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 49 |
| 8. | Danksagung | 59 |
| 9. | Lebenslauf | 60 |
| 10. | Veröffentlichungen | 61 |
| 11. | Erklärung | 61 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| Al | Aluminium |
| ANOVA | analysis of variance; einfaktorielle Varianzanalyse |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| CoCrMo | Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierung |
| Cu | Kupfer |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| EDX | energiedispersive Röntgenspektroskopie |
| Fe | Eisen |
| Lsec | Live second; Einheit für die tatsächliche Messzeit bei der EDX-Analyse |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| MTT | (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazoliumbromid) |
| Mw | Mittelwert |
| Nb | Niob |
| NK | Negativkontrolle |
| P | Phosphor |
| PBS | phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung |
| PK | Positivkontrolle |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate; Natriumlaurylsulfat |
| Ti | Titan |
| V | Vanadium |
| TiAl6Nb7 | Titan - 6 % Aluminium - 7 % Niob |
| TiAl6V4 | Titan - 6 % Aluminium - 4 % Vanadium |

1. Einleitung

In der kieferorthopädischen Behandlung spielt die Nutzung eines Widerlagers für die Bewegung von Zähnen eine entscheidende Rolle. Dieses Wirkprinzip wird als Verankerung bezeichnet. Das Widerlager wird entweder durch eine Gruppe von Zähnen oder eine knöcherne Struktur gebildet. Mit den konventionellen herausnehmbaren oder festsitzenden Apparaturen kann das 3. Newton'sche Gesetz „actio = reactio“ nur bedingt umgangen werden, was in einer mehr oder weniger ausgeprägten Wanderung der zur Verankerung genutzten Zähne resultiert. Verschiedene intra- und extraorale Hilfsgeräte bieten dem Kieferorthopäden zusätzliche Behandlungsmöglichkeiten, sind aber nicht bei allen Patienten gleichwertig einsetzbar und bringen teils erhebliche funktionelle und ästhetische Einschränkungen für den Patienten mit sich. Ein extraorales Hilfsgerät zur skelettalen Verankerung wie der Headgear (Kuroda et al., 2009) wird aufgrund der starken ästhetischen Beeinträchtigung des Patienten nur begrenzt akzeptiert (Büchter et al., 2005). Außerdem überschätzen Patienten häufig die tatsächlich getragene Zeit um bis zu 100 % (Cureton et al., 1993). Intraorale Geräte wie das Pendulum, die eine festsitzende dentale Verankerung bieten, sind dagegen mit geringeren ästhetischen Einbußen verbunden und wirken 24 Stunden täglich (Kinzinger et al., 2008). Ihre Anwendung erfordert allerdings eine ausreichende Anzahl von Zähnen zur Befestigung, die bei erwachsenen Patienten nicht immer gegeben ist (Chaison et al., 2011). Außerdem wird die Mesialisation der Frontzähne durch diese Hilfsgeräte nicht vollständig verhindert (Angelieri et al., 2006).

In den letzten Jahrzehnten etablierte sich mit den Minischrauben eine Form der skelettalen Verankerung, die eine Unabhängigkeit von der Patientencompliance und ein weites Einsatzspektrum bietet. Diese Schrauben, die von der Plattenosteosynthese abgewandelt wurden, können in vielen Bereichen des Ober- oder Unterkiefers – auch interradiär – inseriert werden (Berens und Wiechmann, 2006) und bieten eine zahnunabhängige Verankerungsmöglichkeit. Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts wurden erste Versuche mit Vitallium-Osteosyntheseschrauben (CoCrMo-Legierung) an Hunden durchgeführt. Die Lockerungs- und Verlustrate war allerdings so hoch, dass ein Einsatz am Menschen nach dem damaligen Forschungsstand nicht möglich erschien (Gainsforth und Highley, 1945). Fast 40 Jahre später wurde

eine erfolgreiche Intrusion eines Oberkiefer-Inzisiven am Menschen mit Hilfe einer Vitallium-Schraube beschrieben, die ohne Beschwerden beim Patienten und ohne eine Schraubenlockerung verlief (Creekmore und Eklund, 1983). In den letzten Jahren haben sich vor allem das Design und die bevorzugte Legierung für industriell gefertigte Minischrauben verändert. Die meisten Schrauben sind mittlerweile aus Titan-Legierungen gefertigt und besitzen einen speziellen Kopf für die Befestigung von Bögen, Ketten oder Federn. Das Design der Schrauben variiert von Hersteller zu Hersteller: Einerseits ist das Gewinde selbstbohrend oder selbstschneidend in zylindrischer oder konischer Form gestaltet, andererseits haben viele Hersteller unterschiedliche Kopfformen für die verschiedenen Verwendungszwecke entwickelt. Welche Schraube ein Kieferorthopäde verwendet, hängt nicht nur vom geplanten Behandlungsablauf, sondern auch von persönlichen Erfahrungen ab. Bei der Auswahl sollten im Idealfall auch die Ergebnisse von in-vivo- und in-vitro-Studien eine wichtige Rolle spielen.



Abb. 1: Minischraube im Tuber maxillae
(hier: Dual Top™) zur Distalisation von 16
mit elastischen Ketten
© Klinik für Kieferorthopädie, UKSH Kiel

Die intraorale Lokalisation der Schrauben ist sehr variabel. Sie können sowohl inter-radikulär von vestibulär oder palatinal als auch (para-)median am Gaumen oder retromolar im Ober- oder Unterkiefer eingesetzt werden. Die linguale Insertion wird nicht mehr empfohlen, nachdem die Verlustraten sich dort als zu hoch herausgestellt haben (Berens et al., 2005). Als Gründe für diese Verluste werden einerseits der ungünstige Insertionswinkel, andererseits die ständige Beanspruchung durch Zungenbewegungen genannt. Je nach Gestaltung des Schraubenkopfes können unterschiedliche Hilfsmittel wie elastische Ketten (Abb. 1), Druckfedern, oder starre Verbindungen zum Bogen daran befestigt

werden. Die Insertion der Schraube erfolgt in der Regel unter lokaler Betäubung mit oder ohne Vorbohrung der Kortikalis. Für den Zeitpunkt der Erstbelastung nach der

Insertion gibt es widersprüchliche Empfehlungen: Manche Autoren raten zu einer Einheilphase von ca. einem Monat (Takaki et al., 2010), andere wiederum konnten unabhängig vom Patientenalter keinen Unterschied der Erfolgsrate zwischen sofort belasteten Schrauben und denen mit Einheilphase erkennen und sahen daher keine Notwendigkeit des Wartens (Miyawaki et al., 2003). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die deutlich höhere Erfolgsraten bei Jugendlichen zeigen, wenn eine Einheilphase von 3 Monaten eingehalten wird (Motoyoshi et al., 2007). In einem Versuch an Affen wurde dagegen bei sofortiger Belastung sogar eine verbesserte Osseointegration festgestellt (Romanos et al., 2002).

Eine kieferorthopädische Minischraube kann zur direkten oder zur indirekten Verankerung verwendet werden. Bei der direkten Verankerung wird ein aktives Element direkt am Schraubenkopf und dem zu bewegenden Zahn befestigt (Abb. 2 A). Die indirekte Verankerung stellt eine starre Verbindung der Schraube mit einem oder mehreren Zähnen dar, die ihrerseits als Widerlager für die Bewegung eines anderen Zahnes genutzt werden können (Abb. 2 B).

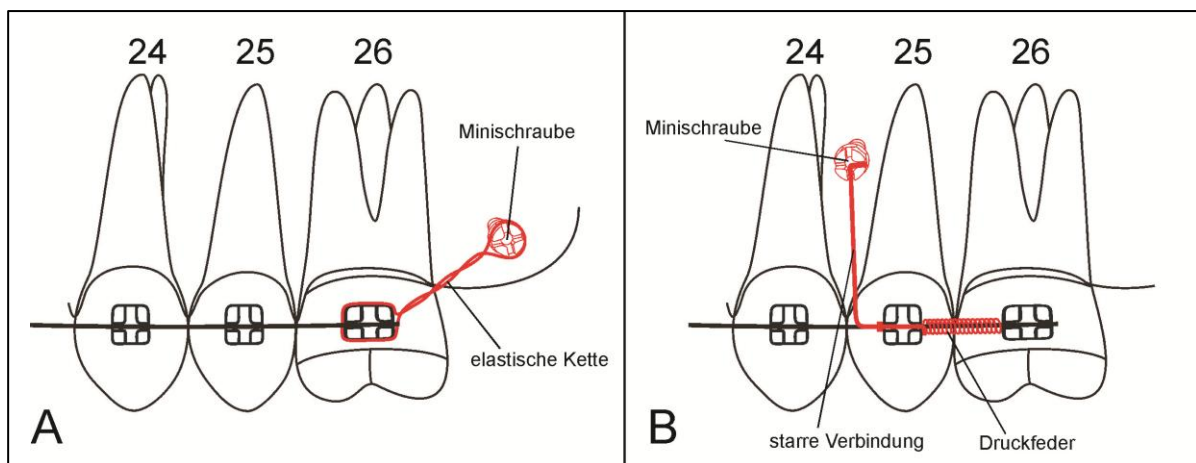


Abb. 2: Verankerung

A: direkte Verankerung; Distalisation von 26 mit Hilfe einer elastischen Kette, die den Zahn zur Minischraube zieht

B: indirekte Verankerung; starre Verbindung vom Zahn 25 zur Minischraube verhindert Mesialisation von 25, Druckfeder zwischen 25 und 26 zur Distalisation von 26

Eine häufig für Minischrauben verwendete Legierung ist Titan-6 % Aluminium-4 % Vanadium (TiAl6V4), welche eine bewährte Legierung für orthopädische Implantate (z.B. Hüftprothesen) und diverse technische Produkte darstellt. Die Korrosionsbeständigkeit von Titan bzw. TiAl6V4 in künstlichem Speichel wird als sehr gut beschrieben, lässt sich aber durch Zugabe von Fluoriden herabsetzen (Schiff et al., 2002; Strietzel et al., 1998). In älteren Veröffentlichungen wurden

Vanadium ab einer Konzentration von 50 μM zytotoxische Effekte auf Osteoblasten zugeschrieben (McKay et al., 1996). Eine Freisetzung von Vanadium aus einer TiAl6V4-Legierung wurde sowohl in vitro bei 10^4 bis 10^5 Abnutzungszyklen (Okazaki et al., 1998) als auch in vivo in den Lungen von Pavianen beschrieben, denen zuvor Implantate aus TiAl6V4 in den Femur, die Tibia und/oder den Humerus eingesetzt worden waren (Woodman et al., 1984). Neuere Studien beschreiben allerdings eine gute Biokompatibilität dieser Legierung (Faria et al., 2008; Jakobsen et al., 2007; Koike et al., 2007) - sowohl mit als auch ohne Oxidschicht (Hoffmann et al., 2005; Watanabe et al., 2004) und nach Oberflächenmodifikation mittels Siliciumcarbid-Papier bzw. Laser (Khosroshahi et al., 2009). Auch Sandstrahlen und Passivierung mit Salpetersäure lassen in vitro weder zytotoxische noch genotoxische Effekte der Legierung erkennen (Velasco-Ortega et al., 2010). Eine 15-stündige Bestrahlung mit UV-Licht (Gallardo-Moreno et al., 2009) scheint ebenso wenig eine Herabsetzung der Biokompatibilität von TiAl6V4 zu bewirken wie wechselnde thermische Belastungen (Faria et al., 2009). Die Anodisierung wird ebenfalls als Oberflächenbearbeitung ohne negative oder sogar mit positiven Einflüssen auf die Biokompatibilität von Titanlegierungen angesehen (Chen et al., 2009; Fini et al., 1999; Harris et al., 2005; Lee et al., 2008; Scharnweber et al., 2002). Sie erhöht sogar durch die fehlerfreie Oxidschicht die Korrosionsbeständigkeit von TiAl6V4 (Velten et al., 2002).

Für die klinische Anwendung kieferorthopädischer Minischrauben ist deren Verlustrate entscheidend. Die Einflussfaktoren für eine Lockerung wurden in den vergangenen Jahren anhand von diversen klinischen Studien untersucht, allerdings kommen die Autoren zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen: Während einerseits die Schraubenlänge (Berens et al., 2005) und der Insertionsort (Berens und Wiechmann, 2006) als stärkste Faktoren bezeichnet werden, machen andere Autoren den Schraubendurchmesser und den Entzündungsgrad des umgebenden Gewebes für den Verlust verantwortlich, sehen aber keine Korrelation zur Länge der Schraube (Miyawaki et al., 2003). In anderen Studien werden die fehlende Osseointegration und ein Nikotinabusus als Einflussfaktoren für Verlustraten bis zu 30 % genannt (Fritz et al., 2004). Auch Unterschiede im Schraubendesign (konisches vs. zylindrisches Gewinde) werden als Gründe für eine verminderte Primärstabilität herangezogen (Kneuert, 2009). Die Nähe zur Wurzel scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Verlustrate der Minischrauben zu haben (Kuroda et al., 2007b).

Andere Studien konnten wiederum keinen der registrierten Parameter mit der Verlustrate in Verbindung bringen (Kuroda et al., 2007a). Laut einem Übersichtsartikel (Crismani et al., 2010) über 14 klinische Studien beträgt die durchschnittliche Erfolgsrate kieferorthopädischer Minischrauben 83,6 %, wobei die einzelnen Erfolgsraten in den 14 Studien von 59,4 % bis 100 % variierten. Ein anderer Übersichtsartikel über 17 Studien (Schätzle et al., 2009) errechnete eine durchschnittliche Erfolgsrate von 84,7 % für Mini- und Mikroschrauben, wobei hier die einzelnen Erfolgsraten zwischen 0 % und 100 % lagen. Allerdings waren bei beiden Reviews die jeweils untersuchten Studien nur bedingt miteinander vergleichbar, da die betrachteten Parameter sehr unterschiedlich waren. Es wurden aber auch hier Schraubenlänge und -durchmesser als wichtige Faktoren genannt, ebenso wie der Insertionsort. Die ermittelten Erfolgsraten wurden von den meisten der oben genannten Autoren als ausreichend für kieferorthopädische Zwecke bezeichnet, da die geplante Verweildauer meist nur 6-12 Monate beträgt und eine Nachimplantation einen vergleichsweise kleinen chirurgischen Eingriff darstellt. Im Vergleich zu den 5-Jahres-Überlebensraten dentaler Implantate, die mit 95,4 % (Pjetursson et al., 2004) oder 96,8 % (Jung et al., 2008) angegeben werden, sind sie allerdings deutlich niedriger.

Zur Beurteilung der Biokompatibilität *in vitro* stehen verschiedene Zelllinien zur Verfügung. Es können entweder primäre Zellen, aus einem Tumor extrahierte oder etablierte immortalisierte Zelllinien verwendet werden. In Studien (Johnson et al., 1983; Souid-Mensi et al., 2008; Wataha et al., 1994) wurde der Einfluss der Zelllinie auf die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests diskutiert. So variierte in letzterer Studie die Reihenfolge von Titan, Aluminium und Vanadium in der Einordnung nach ihrem Zytotoxizitätsgrad je nach Zelltyp. Die Autoren empfehlen daher, einen Zelltyp für die Tests zu verwenden, der dem Gewebe sehr ähnlich ist, das *in vivo* mit der Legierung in Kontakt kommt. Aufgrund dieser Studienergebnisse wurden daher für die vorliegende Studie primäre humane Gingivafibroblasten und eine Osteoblastenzelllinie verwendet. Diese Zelllinien repräsentieren die an die Schraube grenzenden Gewebe (Abb. 3).

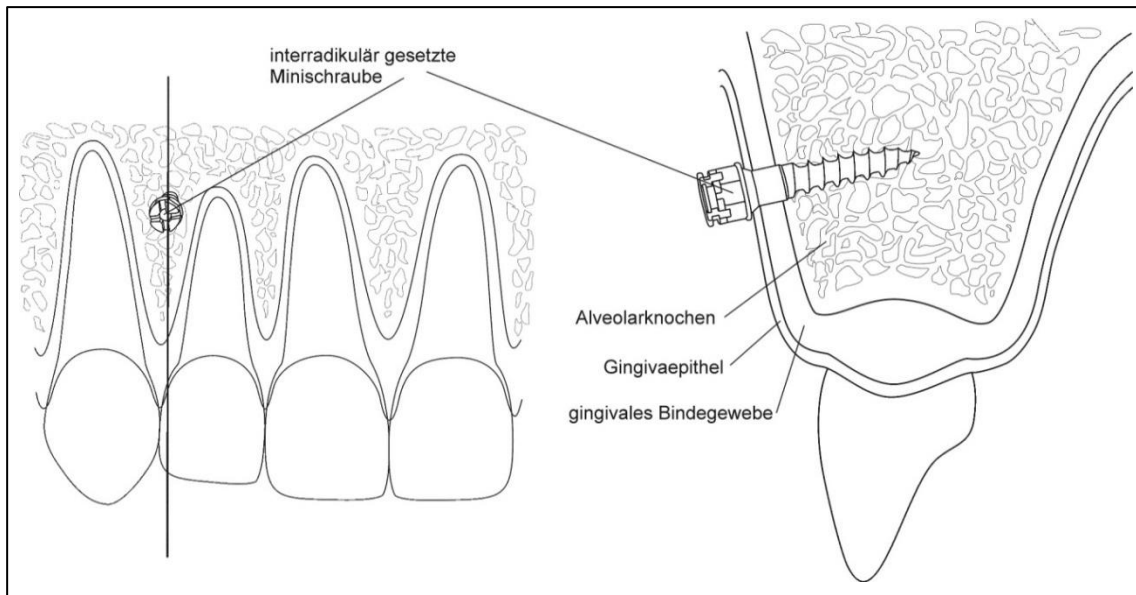


Abb. 3: Lokalisation der Minischraube (hier: OrthoEasy® Pin)

links: Ansicht von vestibulär; interradikuläre Lokalisation der Schraube

rechts: Ansicht von approximal; Gewebe in Kontakt mit der Schraube: Gingivaepithel, gingivales Bindegewebe, Alveolarknochen

Die Aussagekraft eines in-vitro-Tests über wenige Tage für die in-vitro-Biokompatibilität über 8 Monate wurde anhand von Tests mit Maus-Fibroblasten und humanen Makrophagen bestätigt (Wataha et al., 1999). Der Zeitraum von 8 Monaten entspricht etwa der Verweildauer einer kieferorthopädischen Minischraube im Mund des Patienten.

1.1. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war die Beurteilung der Biokompatibilität bzw. Zytotoxizität kieferorthopädischer Minischrauben und der Vergleich unterschiedlicher Produkte vergleichbarer Größe. Der Einfluss von Unterschieden in der Oberflächenbeschaffenheit auf die Biokompatibilität sollte in dieser Dissertation festgestellt werden.

Es wurden sowohl quantitative als auch qualitative Zytotoxizitätstests in vitro und eine Oberflächenbeurteilung mittels Rasterelektronenmikroskop durchgeführt um folgende Fragen zu beantworten:

- Sind zytotoxische Effekte kommerzieller kieferorthopädischer Minischrauben aus einer TiAl6V4-Legierung in vitro nachzuweisen?
- Geben Oberflächenveränderungen, z. B. durch kommerzielle Anodisierung, Hinweise auf eine verminderte Biokompatibilität?
- Gibt es Unterschiede in der Biokompatibilität verschiedener Minischrauben mit anodisierter bzw. unbehandelter Oberfläche?

2. Material und Methoden

Alle Versuche wurden in der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

2.1. Kieferorthopädische Minischrauben

Gegenstand der Studie waren 4 verschiedene Minischrauben unterschiedlicher Hersteller:

1. tomas®-pin SD-N 08 1,6 x 8 mm (Dentaurum Nr. 302-108-30, Pforzheim/Ispringen, Deutschland) mit einer Gesamtoberfläche von ca. 79 mm² und einem Gewicht von ca. 108 mg (Abb. 4).
2. OrthoEasy® Pin 1,7 x 8 mm (Forestadent® Nr. 1101A2308, Pforzheim, Deutschland) mit einer Gesamtoberfläche von ca. 103 mm² und einem Gewicht von ca. 126 mg (Abb. 5).
3. Dual Top™ G2 1,6 x 8 mm (Jeil Medical, Seoul, Korea über Promedia Medizintechnik Nr. 16-G2-008, Siegen, Deutschland) mit einer Gesamtoberfläche von ca. 80 mm² und einem Gewicht von ca. 74 mg (Abb. 6).
4. LOMAS-Schraube 1,5 x 9 mm flach (Mondeal® Medical Systems GmbH Nr. 33-11509, Mühlheim an der Donau, Deutschland) mit einer Gesamtoberfläche von ca. 114 mm² und einem Gewicht von ca. 96 mg (Abb. 7).

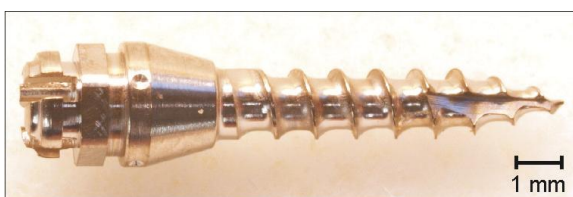


Abb. 4 tomas®-pin



Abb. 5 OrthoEasy® Pin



Abb. 6 Dual Top™ G2

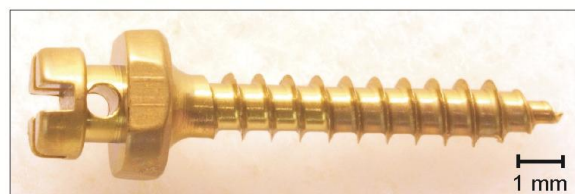


Abb. 7 LOMAS Schraube

Alle vier Produkte wurden laut Herstellerangaben aus TiAl6V4-Legierungen gefertigt. Diese Legierung wird in Deutschland laut DIN ISO 5832-3 unter der Werkstoff-

nummer 3.7165 geführt (Deutsches Institut für Normung e. V., 1996). Einige Hersteller beziehen sich bei der Materialangabe auf die ASTM F136 (American Society for Testing and Materials, 2008), deren Angaben zu Legierungsbestandteilen nahezu identisch mit denen der ISO-Norm sind. Zusätzlich wurden die Oberflächen des OrthoEasy® Pins und der LOMAS-Schraube laut Herstellerangaben nach der Herstellung und Reinigung anodisiert um eine Färbung zu erreichen. Diese hängt von der Dicke (10-200 nm) der Oxidschicht ab (Velten et al., 2002). Von jedem Produkttyp wurden 54 Schrauben für die Versuche verwendet, davon je 12 für die Eluatherstellung, 26 für den direkten MTT-Test und 16 für den direkten Agar-Overlay-Test. Die Minischrauben wurden unsteril vom Hersteller geliefert und für die Zellkultur wie folgt aufbereitet: Zunächst wurde jede Schraube im Ultraschallbad 15 Minuten bei 30 °C in Alkohol gereinigt und desinfiziert und dann 15 Minuten bei 130 °C sterilisiert. Die sterilisierten Schrauben wurden bis zum jeweiligen Versuch steril aufbewahrt. Vor den Zellkulturversuchen wurden jeweils 5 Schrauben für die Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop und die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX-Analyse) verwendet. Diese Schrauben wurden vorher im Ultraschallbad gereinigt und desinfiziert und nach der Untersuchung wie oben beschrieben für die Zellkultur aufbereitet.

2.2. Rasterelektronenmikroskop / Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Zur mikroskopischen Beurteilung der Schraubenoberfläche wurden rasterelektronenmikroskopische Bilder (Philips XL30CP, FEI™, Eindhoven, Niederlande) von unterschiedlichen Bereichen der Schrauben angefertigt. Bei dieser Technik wird ein gebündelter Elektronenstrahl durch Ablenkspulen rasterförmig über die Probe geführt und erzeugt an der Probenoberfläche Sekundärelektronen, Rückstreuелеktronen und Röntgenstrahlung (Abb. 8).

Die Sekundärelektronen treffen auf Detektoren und erzeugen einen topografischen Kontrast (Hornbogen und Skrotzki, 2009b). Für die Aufnahmen wurden die Schrauben mit einer sterilen Pinzette auf einem Messteller fixiert. Der Kopf, das Gewinde und die Spitze wurden bei 50-, 100- und 500-facher Vergrößerung

abgebildet. Die fotografierten Ausschnitte wurden nach Betrachtung verschiedener Abschnitte der Schrauben repräsentativ für die Oberfläche ausgewählt.

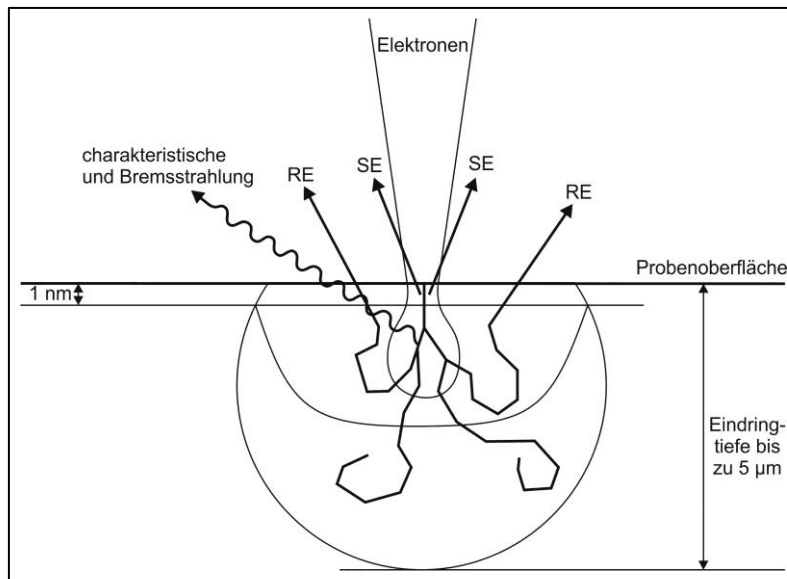


Abb. 8: Funktionsweise Rasterelektronenmikroskop und EDX-Analyse: Einfallende Elektronen erzeugen im oberflächlichen 1 nm Sekundärelektronen (SE), aus denen ein topografisches Bild der Oberfläche errechnet wird. Rückstreuerelektronen (RE) aus tieferen Schichten bis zu 5 µm können ebenfalls zur Bildgewinnung verwendet werden. Charakteristische und Bremsstrahlung (Röntgenstrahlung) werden zur Analyse der Elemente detektiert. Abbildung nach Eggert, 2005 und Colliex, 2008

Zusätzlich wurde eine Bestimmung der Legierung an jeweils 12 Messpunkten (3 am Kopf, 3 am Hals, 3 am Gewinde und 3 an der Spitze) der Oberfläche von 5 Schrauben mit der EDX-Analyse durchgeführt, um die Herstellerangaben zu überprüfen und ggf. Unterschiede zwischen den Produkten festzustellen. Dafür wird mit einem Detektor die charakteristische Röntgenstrahlung gemessen, die in dem Bereich einer Probe entsteht, die mit den Elektronen in Wechselwirkung tritt (Hornbogen und Skrotzki, 2009a). Anhand der Energie dieser charakteristischen Strahlung kann bestimmt werden, welche Elemente in der Legierung enthalten sind, und die Zahl der emittierten Röntgenquanten über eine Zeiteinheit lässt eine quantitative Beurteilung des Elementgehalts zu (Eggert, 2005). Die Messung erfolgte in Anlehnung an Empfehlungen für die „Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse mit dem EDX im Rasterelektronenmikroskop“ (Eggert, 2005) in jeweils mindestens 200 Lsec pro Messstelle bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV. Bei dieser Spannung ist von einer mittleren Eindringtiefe von max. 5 µm in eine TiAl6V4-Probe auszugehen, da die Eindringtiefe und Ausdehnung von der Primärelektronenenergie, der Dichte der Probe und den Probenatomen abhängt (Colliex, 2008; Eggert, 2005):

$$Z_M = 0,033 \cdot (E_0^2 - E_C^2) / \rho$$

Z_M = mittlere Eindringtiefe; E_0 = Primärelektronenenergie in keV; E_C = kritische Anregungsenergie des Atoms in keV; ρ = Dichte der Probe in g/cm³

Allerdings stammt die detektierte charakteristische Strahlung aufgrund der Selbstabsorption der Probe und deren unregelmäßiger Oberfläche aus einer deutlich geringeren Schicht (ca. 1 μm).

Da die Kalibrierung mit einer Kupfer-Aluminium-Probe und nicht mit einer TiAl6V4-Probe erfolgte, wurden die Mengen eines Elements in der Probe nicht absolut bestimmt, sondern in Prozent des mit Elektronen bestrahlten Probenareals angegeben. Es wurden jeweils der Mittelwert (Mw) und die Standardabweichung (SD) der Messwerte gebildet und mit den Herstellerangaben verglichen. Zusätzlich wurden bei einer Schraube pro Herstellerfirma an 12 Messpunkten je 3 Messungen durchgeführt um die Messungenauigkeit innerhalb eines Messpunktes abzuschätzen. Dann wurde jeweils der Mittelwert aus den 12 Standardabweichungen mit je 3 Messungen angegeben.

Nach der Auswertung der EDX-Messungen wurden je 4 Schrauben pro Hersteller im Bereich des Halses durchgesägt und geschliffen um zu überprüfen, ob die an der Oberfläche gemessenen Elemente alle in der Grundlegung vorhanden sind oder teilweise nur Rückstände der Oberflächenbeschichtung oder der Bearbeitungswerkzeuge darstellen.

2.3. Zellkultur

Für die vorliegende Studie wurden zwei Zelllinien verwendet: primäre humane Gingivafibroblasten und eine etablierte permanente humane Osteoblastenzelllinie. Die primären Gingivafibroblasten wurden aus Explantaten gewonnen, die im Zuge einer Zahnextraktion beim Patienten entnommen wurden und deren Zelltyp morphologisch nachgewiesen wurde. Die Osteoblasten wurden kommerziell erworben (SAOS-2, DSMZ Nr. ACC 243, Braunschweig, Deutschland). Die Zellkultur und die sterilen Arbeitsschritte der Versuche erfolgten an einer sterilen Werkbank (HB 2472 K, Heraeus Instruments Lamin Air, Hanau, Deutschland). Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask 75cm², Sarstedt Inc. Nr. 83.1813.002, Newton, NC, USA bzw. Nümbrecht, Deutschland) ausgesät und einmal wöchentlich passagiert. Als Nährmedium für die Fibroblasten diente α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH Nr. M0644, Steinheim, Deutschland), das mit 2,2 g NaHCO₃ in einem Liter Aqua dest. gelöst und

mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt wurde. Auf 440 ml steril filtriertes Medium wurden zur besseren Proliferation und Adhärenz zusätzlich 50 ml fetales Kälberserum (Foetal Bovine Serum Standard Quality, PAA Nr. A15-101, Pasching, Österreich) und zur Verhinderung einer Keimbesiedlung 5 ml Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, PAA Nr. P11-010) und 5 ml Antimykotika (Amphotericin B, PAA Nr. P11-001) gegeben. Dem Osteoblasten-Nährmedium (DMEM, PAA Nr. E15-843) wurde auf 440 ml zusätzlich zu den oben genannten Zusätzen (Kälberserum, Penicillin / Streptomycin, Amphotericin B) 1 ml Dexamethason (Dexamethasone, Serva Electrophoresis GmbH Nr. 18660, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei feuchter Atmosphäre im Brutschrank (B5060EK/CO₂, Heraeus Instruments) bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung für einen konstanten pH-Wert von 7,4. Alle 2-3 Tage wurde das Medium abgesaugt und neues Medium zu den Zellen gegeben. Einmal wöchentlich wurde eine Passage der Zellen nach folgendem Ablauf durchgeführt: Die Zellen wurden vom Medium befreit und mit 3 ml PBS-Puffer (Dulbecco's PBS, PAA Nr. H15-002) pro Flasche gespült um eine Inhibierung des Trypsins durch das Kälberserum zu vermeiden. Anschließend wurden 3 ml Trypsin-Lösung (Trypsin-EDTA, PAA Nr. L11-003 1:10 verdünnt mit PBS-Puffer) auf die Zellen gegeben und zur Aktivierung der enzymatischen Aktivität 5 Minuten im Brutschrank belassen. Dadurch wurden die Zellen aus ihrem Verbund und vom Flaschenboden gelöst und konnten in ein Zentrifugenröhrchen (Röhre 50 ml, Sarstedt Inc. Nr. 62.547.254) pipettiert werden. Anschließend wurde die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von 4 ml Medium pro Zellkulturflasche gestoppt und der Überstand nach 9-minütigem Zentrifugieren bei 1800 U/min (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments) abgesaugt. Nach Zugabe von 10 ml Medium wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung (Trypan Blue, Serva Electrophoresis GmbH) und der Neubauer-Zählkammer (Neubauer-improved, Marienfeld-Superior Nr. 0640010, Lauda Königshofen, Deutschland) im Lichtmikroskop (Optiphot-2, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bestimmt und pro Flasche 3×10^5 Zellen in 10 ml Medium ausgesät.

2.4. Eluat-Herstellung

Für die Eluatherstellung wurde phenolrotfreies Medium benötigt, damit die Messung der optischen Dichte im MTT-Test nicht durch das Phenolrot beeinflusst wird. Hierfür wurde MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH Nr. M3024) mit 2,2 g NaHCO_3 und 0,292 g L-Glutamin in einem Liter Aqua dest. gelöst. Die weiteren Zusätze wurden entsprechend der α -MEM-Herstellung hinzugegeben. Um eine eventuelle Abgabe von Stoffen in ein flüssiges Medium zu testen, wurden in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 10271 (Deutsches Institut für Normung e. V., 2001) pro Schraubentyp 12 Eluatansätze hergestellt. Dazu wurde pro Eluatansatz jeweils eine Schraube 72 h in 500 μl phenolrotfreiem Medium im Brutschrank belassen. Danach wurden die Schrauben aus dem Medium entfernt und nicht weiter verwendet. Um eine Veränderung des Mediums während der 72 h im Brutschrank auszuschließen, wurde als Negativkontrolle phenolrotfreies Medium 72 h im Brutschrank belassen (konditioniertes Medium).

Von den gewonnenen 500 μl Eluat pro Schraube wurden 350 μl für die indirekten MTT-Tests (7 Vertiefungen à 50 μl) und 60 μl für die Agar-Overlay-Tests verwendet.

2.5. Quantitative Beurteilung der Zytotoxizität: MTT-Test

Für die quantitative Beurteilung der Zytotoxizität der Minischrauben wurde die Zellvitalität mit MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazoliumbromid) (MTT, Serva Electrophoresis GmbH Nr. 20395) gemessen, einerseits nach direktem Kontakt der Zellen mit den Schrauben (direkter MTT-Test), andererseits nach Kontakt der Zellen mit dem jeweiligen Eluat (indirekter MTT-Test). Der Versuchsablauf wurde in Anlehnung an die ISO-Norm 10993-5 (Deutsches Institut für Normung e. V., 2009) festgelegt. Für den direkten MTT-Test wurden 5×10^4 Zellen in 500 µl phenolrotfreiem Medium pro Vertiefung in 24-well-Platten ausgesät. Nach 90-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde eine Schraube pro Vertiefung auf die Zellen gelegt und für 48 h dort belassen. Pro Schraubentyp und Zellart wurden 12 Vertiefungen bestückt und in einigen Reihen wurden als Negativkontrolle unbehandelte Zellen belassen. Es wurden zusätzlich je 2 Vertiefungen pro Schraubentyp mit Medium und einer Schraube und zu Beginn der Messreihe eine Reihe ausschließlich mit Medium bestückt. Dadurch sollte der Einfluss der Schrauben auf das Medium und dessen Einfluss auf die Messwerte beurteilt werden. Als Positivkontrolle wurde in einigen Reihen Natriumlaurylsulfat (SDS, Biorad Laboratories Nr. 161-0302, Hercules, CA, USA) zu den Zellen gegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 125 µl 12 mM (5 mg MTT/ml PBS) MTT-Lösung pro Vertiefung hinzugegeben und die Platten 3 h im Brutschrank belassen. Die Zellen wurden dementsprechend mit einer 2,4 mM MTT-Lösung inkubiert. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT wird von mitochondrialen Dehydrogenasen (Mosmann, 1983) und Enzymen anderer Zellkompartimente zu blau-violetttem Formazan reduziert (Bernas und Dobrucki, 2002) (Abb. 9) und lässt daher auf die Zellvitalität im Vergleich zu einer Negativkontrolle schließen.

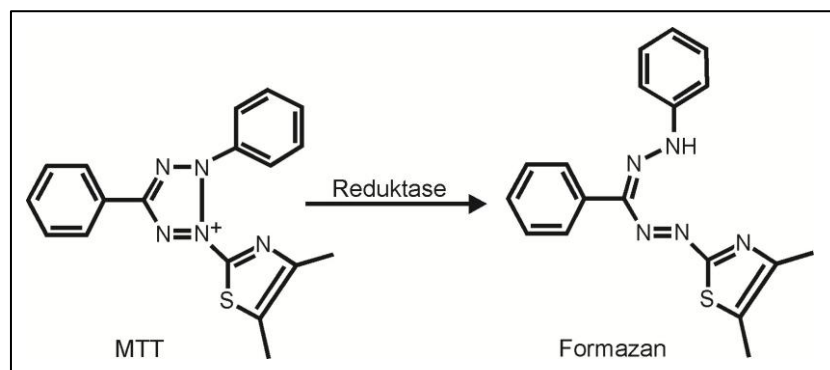


Abb. 9: Enzymatische Reduktion des gelben MTTs zu blau-violetttem Formazan

Nach Zugabe von 500 µl 10 %ig in 0,01 N HCl gelöstem SDS pro Vertiefung wurden die Platten erneut für 24 h inkubiert um eine vollständige Zytolyse zu ermöglichen. Zur Auswertung wurden jeweils 175 µl der Suspension in die Vertiefungen einer 96-well-Platte (Tissue Culture Plate 96-well, Sarstedt Inc. Nr. 83.1835.003) überführt. Dadurch ergaben sich pro Schraubentyp n=60 Messwerte aus 12 Reihen mit je 5 Vertiefungen. Die Schrauben wurden nach Beendigung der Messungen aus den Vertiefungen entfernt und nicht weiterverwendet.

Die Zellaussaat für den indirekten MTT-Test erfolgte in 96-well-Platten. Hierzu wurden pro Vertiefung 10^4 Zellen in 50 µl phenolrotfreiem Medium ausgesät und nach 90-minütiger Inkubation 50 µl Eluat hinzugegeben. Als Negativkontrolle diente konditioniertes Medium und als Positivkontrolle SDS. Zusätzlich wurde eine Reihe mit Zellen angelegt, die weder mit Eluat noch mit konditioniertem Medium in Kontakt gekommen waren (unbehandelte Zellen) und eine Reihe mit frischem Medium um die Veränderung des Mediums durch die 72-stündige Inkubation im Brutschrank und dessen Einfluss auf die Zellen zu beurteilen. Nach 48-stündiger Inkubation wurden zunächst 25 µl MTT und 3 h später 100 µl SDS auf die Zellen gegeben. Die Zellen kamen also auch bei diesem Versuchsablauf mit 2,4 mM MTT-Lösung in Kontakt. Auch hier wurden nach 24 h jeweils 175 µl der Suspension zur Auswertung in die Vertiefungen einer neuen 96-well-Platte überführt. Pro Eluat standen hier 7 Vertiefungen für die Messung zur Verfügung. Da pro Schrauben- und Zelltyp je 6 Schrauben eluiert wurden, lagen für die statistische Auswertung n=42 Messwerte vor.

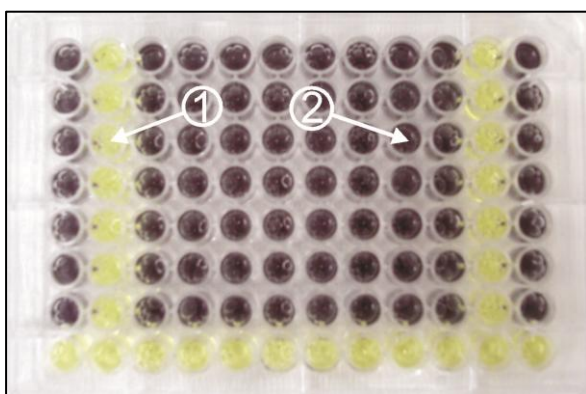


Abb. 10: 96-well-Platte

Positivkontrollen (gelbes MTT, Pfeil 1) und von Zellen zu blau-violetter Formazan umgesetztes MTT (Pfeil 2)

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde anschließend die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers (µQuant, BioTek® Instruments Inc., Bad Friedrichshall, Deutschland) und der Software Mikrowin 3.33 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) bei einer Filterwellenlänge von 570 nm und einer Referenzfilterwellenlänge von 630 nm gemessen.

2.6. Qualitative Beurteilung der Zytotoxizität: Agar-Overlay-Test

Zur qualitativen Beurteilung der Zytotoxizität der Minischrauben wurde ein Agar-Overlay-Test mit einer Neutralrot-Vitalfärbung durchgeführt. Auch dieser Versuch wurde in Anlehnung an die ISO-Norm 10993-5 (Deutsches Institut für Normung e. V., 2009) durchgeführt. Für diesen Test wurden je 5 ml Medium mit 5×10^5 (Fibroblasten) bzw. 7×10^5 (Osteoblasten) Zellen pro Vertiefung in 6-well-Platten (Tissue Culture Plate 6-well, Sarstedt Inc. Nr. 83.1839) ausgesät. Nach 48-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die konfluent gewachsenen Zellen mit PBS-Puffer und phenolrotfreiem Medium gespült und mit einer Agar-Schicht bedeckt. Hierfür wurden 40 ml doppelt konzentriertes MEM ohne Phenolrot (Herstellung analog zum phenolrotfreien Medium für die Eluatherstellung, allerdings mit 500 ml Aqua dest.) im Wasserbad (1083 GFL®, Burgwedel, Deutschland) auf eine Temperatur von 38 °C gebracht und 1 g Agar (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH Nr. A7049) mit 40 ml Aqua dest. auf einem Magnetrührer (MR 2002, Heidolph, Schwabach, Deutschland) erhitzt. Nachdem der Agar auf 38 °C abgekühlt war, wurde er mit dem erwärmten doppelt konzentrierten Medium vermischt und 0,9 ml pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die Konzentration des Agars betrug daher beim Aufbringen auf die Zellen 1,25 %. Die Platten wurden anschließend für 30 Minuten ruhig stehen gelassen um Bewegungen während der Aushärtung des Agars und daraus folgende Abweichungen der Schichtdicke zu vermeiden. Die Menge und Konzentration des Agars wurde in einem Vorversuch mit Medium- bzw. Nickel-Lösung-Plättchen bestimmt, um sowohl die Diffusion des Farbstoffs als auch der evtl. freigegebenen Ionen zu ermöglichen und zusätzlich zu gewährleisten, dass die Schicht bei allen Vertiefungen eine vergleichbare Dicke hat und die Proben nicht im erkalteten Agar versinken. Für die Färbung der vitalen Zellen wurde eine 0,01 %ige Neutralrot-Lösung angesetzt. Dazu wurde eine Stammlösung aus 0,1 g Neutralrot (Merck Nr. 101369, Darmstadt, Deutschland) in 10 ml Aqua dest. hergestellt, die wiederum 1:100 mit PBS-Puffer verdünnt wurde. Von dieser Lösung wurden 0,9 ml pro Vertiefung auf den erkalteten Agar gegeben und der Überschuss nach 20 Minuten entfernt. Dieser Farbstoff (3-Amino-7-dimethylamino- 2-methylphenazin hydrochlorid; N8,N8,3-Trimethyl- 2,8-phenazindiamin monohydrochlorid) wird bei vitalen Zellen in den Lysosomen angereichert, da er bei $\text{pH} < 7,4$ als Kation vorliegt und an die

anionischen Reste der lysosomalen Matrix bindet (Borenfreund und Puerner, 1984; Nemes et al., 1979). Dadurch erlaubt er sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch Rückschlüsse auf die Vitalität von Zellen. Im Anschluss an diese Färbung wurden die zu testenden Objekte mittig auf den Agar gelegt (Abb. 11). Als Proben dienten bei diesem Test pro Typ und Zellart je 8 Schrauben und je 18 mit 20 µl Eluat getränkte sterilisierte Glasfaserplättchen mit einem Durchmesser von



Abb. 11: Agar-Overlay Plattenbelegung

oben: Minischrauben

unten: eluatgetränkte Glasfaserplättchen

Nach Überdeckung der vitalen Zellen mit einer Agar-Schicht und Färbung mit Neutralrot wurden die Proben in die Mitte der Vertiefungen auf den Agar gelegt und 24 h dort belassen.

Anschließend wurde der Zustand der Zellen unterhalb des Agars beurteilt.

5,5 mm und einer Dicke von 0,5 mm (GF 55, Whatman® Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland). Als Negativkontrolle dienten einerseits Glasfaserplättchen mit phenolrotfreiem MEM (NK₁) und andererseits Vertiefungen ohne jegliche Probenzugabe (NK₂). Positivkontrollen wurden unter Verwendung von mit 20 µl Nickellösung (PK₁: 500 mg/l bzw. PK₂: 300 mg/l) getränkten Glasfaserplättchen und mit 0,3 mm dicken, 12 mm langen Kupferdrähten (PK₃) hergestellt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Proben entfernt und die Platten makroskopisch mit Hilfe eines Scanners (SnapScan 1236, AGFA, Mortsel, Belgien) bei einer Auflösung von

3000 dpi fotografiert. Anschließend wurde die Zellentfärbung und Zellzerstörung mikroskopisch beurteilt (BioStar, Reichert® Microscope Services, Depew, NY, USA) und bei 20-facher Vergrößerung fotografiert (CF11/1, Kappa optronics GmbH, Gleichen, Deutschland). Dabei wurden jeweils Aufnahmen unterhalb der Probe und bei Auffälligkeiten in dem Bereich ebenfalls Aufnahmen aus der direkten Umgebung der Probe gemacht. Die Zellen wurden im mikroskopischen Bild unter folgenden Fragestellungen beurteilt (Abb. 12): Ist das Zytoplasma deutlich rot gefärbt? Sind entfärbte Zellen zu sehen? Sind die Zellgrenzen der entfärbten Zellen noch deutlich sichtbar? Gibt es Bereiche, in denen keine Zellen mehr zu erkennen oder deutliche Lücken zwischen den verbliebenen Zellen sichtbar sind?

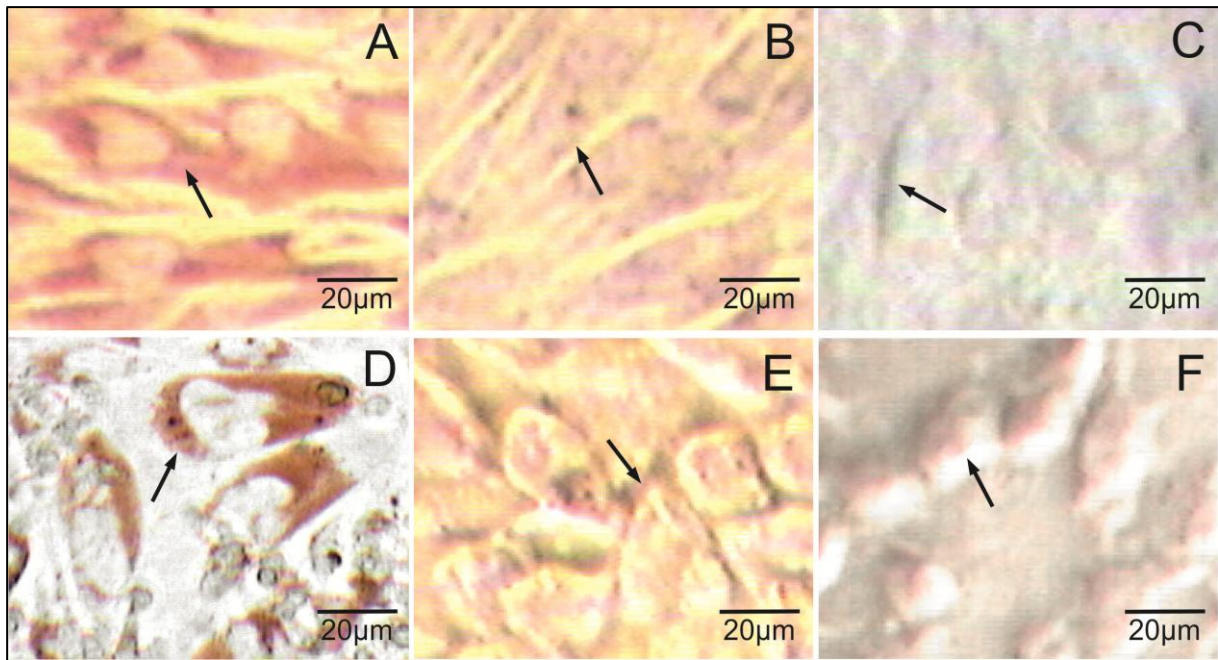


Abb. 12: Neutralrot-Vitalfärbung an Fibroblasten (A-C) und Osteoblasten (D-F)

A: vitale Fibroblasten: deutlich rot gefärbtes Zytoplasma (**Pfeil**) und blasser Zellkern

B: entfärbte Fibroblasten: Zellgrenzen deutlich erkennbar (**Pfeil**)

C: zerstörte Fibroblasten: wenige Reste von Zellen oder Extrazellulärmatrix erkennbar (**Pfeil**)

D: vitale Osteoblasten: deutlich rot gefärbtes Zytoplasma (**Pfeil**) und blasser Zellkern

E: entfärbte Osteoblasten: Zellgrenzen noch erkennbar (**Pfeil**)

F: zerstörte Osteoblasten: wenige kugelige, entfärbte Zellen erkennbar (**Pfeil**), dazwischen deutliche Lücken

2.7. Statistik

Die Normalverteilung der MTT-Testergebnisse wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test verifiziert. Zur Ermittlung statistisch signifikanter Abweichungen zwischen den Produkten und zu den Negativkontrollen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Mittelwertvergleich nach Bonferroni durchgeführt. Als Bezugsgröße (100 %) wurde im direkten MTT-Test die optische Dichte der unbehandelten Zellen benannt. Im indirekten MTT-Test diente die optische Dichte der Zellen, die mit konditioniertem Medium in Kontakt gebracht worden waren als Bezugsgröße. Die optischen Dichten der Zellen, die mit den Schrauben oder deren Eluaten inkubiert worden waren, wurden jeweils als Prozentsatz davon angegeben. Zur Beurteilung der Veränderung des Mediums durch die 72-stündige Inkubation im Brutschrank wurde die optische Dichte des konditionierten Mediums mit der des frischen Mediums verglichen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Origin 5.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Schrauben zeigten bei 500-facher Vergrößerung einige Auffälligkeiten an den Oberflächen (Abb. 12-15). Bei allen vier Produkten waren feine Rillen im Bereich des Gewindes und der Spitze zu sehen. Außerdem zeigten alle vier Produkte geringe Ablagerungen, die durch die Reinigung und Desinfektion nicht entfernt wurden, sowie Überstände des Metalls entweder an der Spitze, am Gewinde oder an den Kanten des Schraubenkopfes. Die Schneidekante und die Spitze des tomas®-pins waren weniger spitz als die der anderen drei Produkte (Abb. 13 A, B) und die Oberfläche im Vergleich zu den anderen Produkten am wenigsten aufgeraut. Er zeigte feine Rillen im Bereich der Kerbe an der Gewindespitze und Materialüberstände an deren Rand (Abb. 13 C), am Übergang von der Schneide zur Flanke des Gewindes (Abb. 13 A) und an den Kanten des Schraubenkopfes (Abb. 13 D). Beim OrthoEasy® Pin waren stärkere Rillen an der Flanke des Gewindes zu sehen und die Gewindeschneide erschien schmaler und ungleichmäßig (Abb. 14 A). Auch hier zeigten sich Materialüberstände an den Kanten des Schraubenkopfes (Abb. 14 C) und Ablagerungen an der Spitze (Abb. 14 B) und am Kopf (Abb. 14 D). Auffällig war zudem die Oberflächenstruktur am Schraubenkopf (Abb. 14 C, D). Ähnlich ausgeprägte Rillen wie beim OrthoEasy® Pin waren an der Flanke des Dual Top™ zu sehen, außerdem waren hier am Übergang von der Flanke zur Schneide des Gewindes Überstände zu erkennen (Abb. 15 A). Wie beim tomas®-pin konnte man am Rand der Kerbe an der Schraubenspitze Materialüberstände erkennen (Abb. 15 C), die Oberfläche am Kopf wirkte allerdings sehr glatt (Abb. 15 D). Die Spitze der LOMAS-Schraube zeigte leichte Oberflächenunebenheiten, allerdings keine Materialüberstände (Abb. 16 A). Die Rillen an den Gewindeflanken waren geringer als beim OrthoEasy® Pin und beim Dual Top™, die Schneide zeigte allerdings ähnliche Unregelmäßigkeiten wie die des OrthoEasy® Pins. Materialüberstände oder Ablagerungen waren nur an der Bohrung am Kopf einzelner Schrauben zu erkennbar (Abb. 16 C, D).

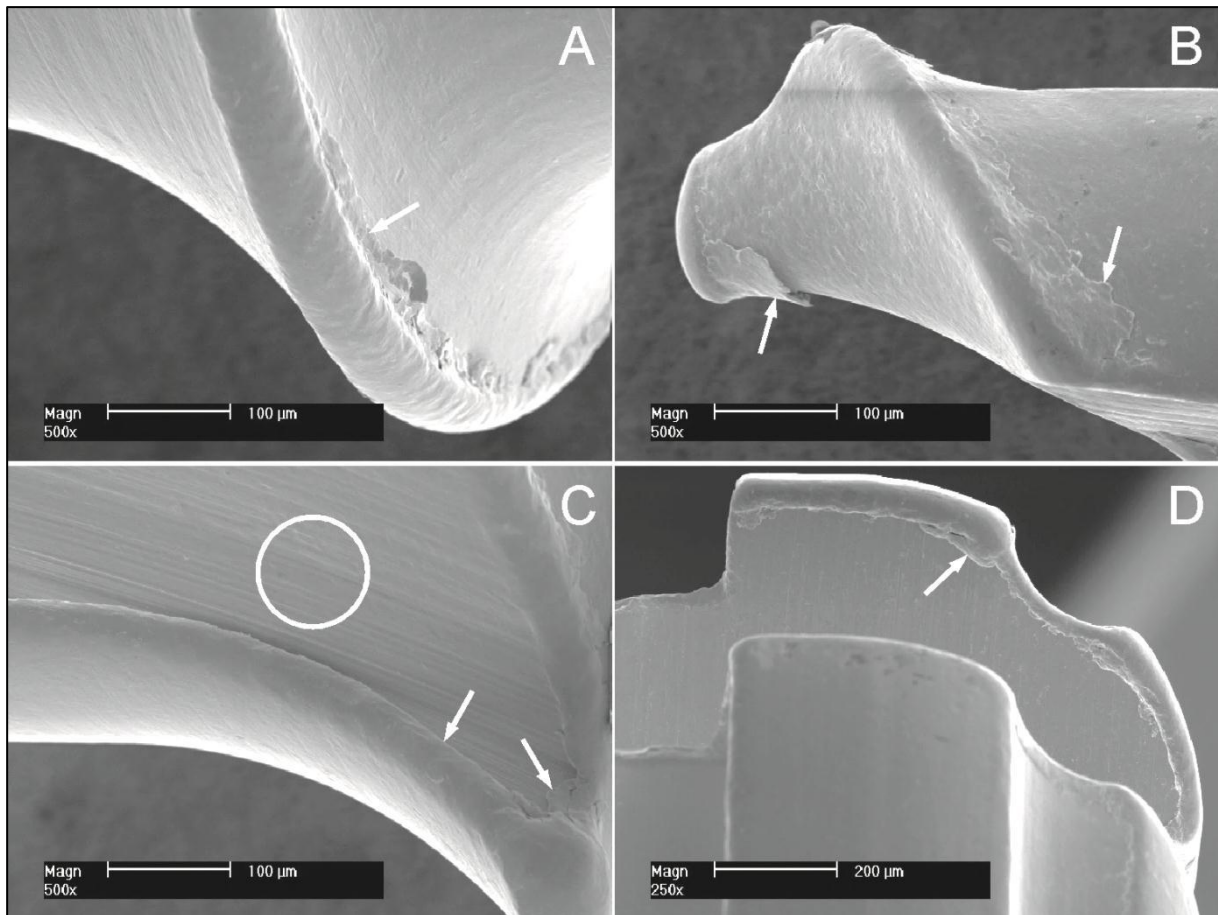


Abb. 13: tomas®-pin

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Schraubenoberfläche nach Reinigung in Alkohol im Ultraschallbad zeigten eine weitgehend glatte Oberfläche in fast allen Bereichen des tomas®-pins.

A: Materialüberstände am Übergang der Schneide zur Flanke (**Pfeil**), glatte Oberfläche an der Flanke

B: Materialüberstände an der Spitze der Schraube (**Pfeile**)

C: feine Rillen im Bereich der Kerbe an der Spitze (**Kreis**) und Materialüberstände (**Pfeil**)

D: Materialüberstände an den Kanten im Bereich des Schraubenkopfes (**Pfeil**), glatte Oberfläche

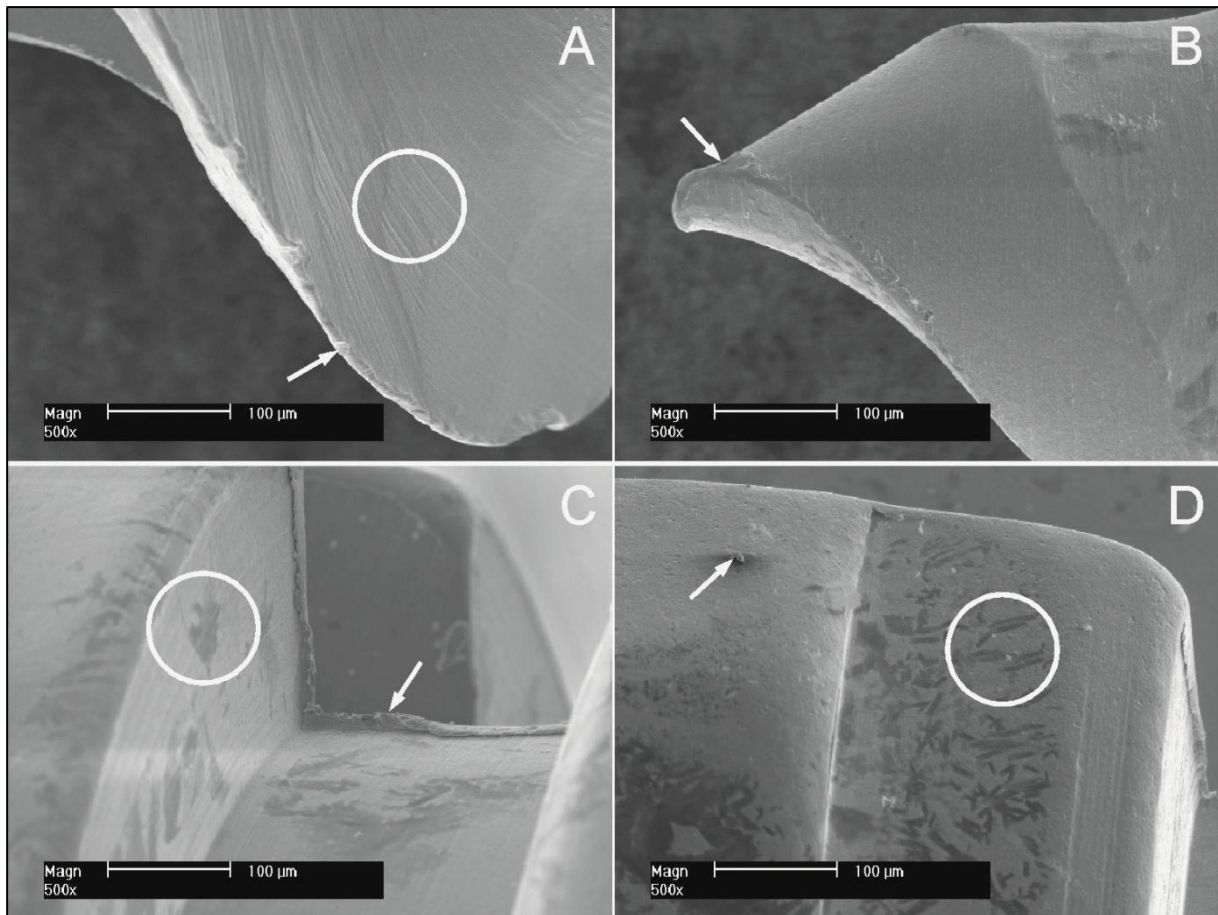


Abb. 14: OrthoEasy®

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Schraubenoberfläche nach Reinigung in Alkohol im Ultraschallbad zeigten leichte Rillen und Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche des OrthoEasy®. Außerdem fiel die schmale Schneide auf.

A: Kerben an der Schneide (**Pfeil**) und leichte Rillen an der Flanke (**Kreis**)

B: geringe Ablagerungen oder Materialüberstände an der Spitze der Schraube (**Pfeil**)

C: Oberflächenunregelmäßigkeiten am Kopf (**Kreis**) und Materialüberstände an dessen Kanten (**Pfeil**)

D: Oberflächenunregelmäßigkeiten (**Kreis**) und geringe Ablagerungen (**Pfeil**) am Schraubenkopf

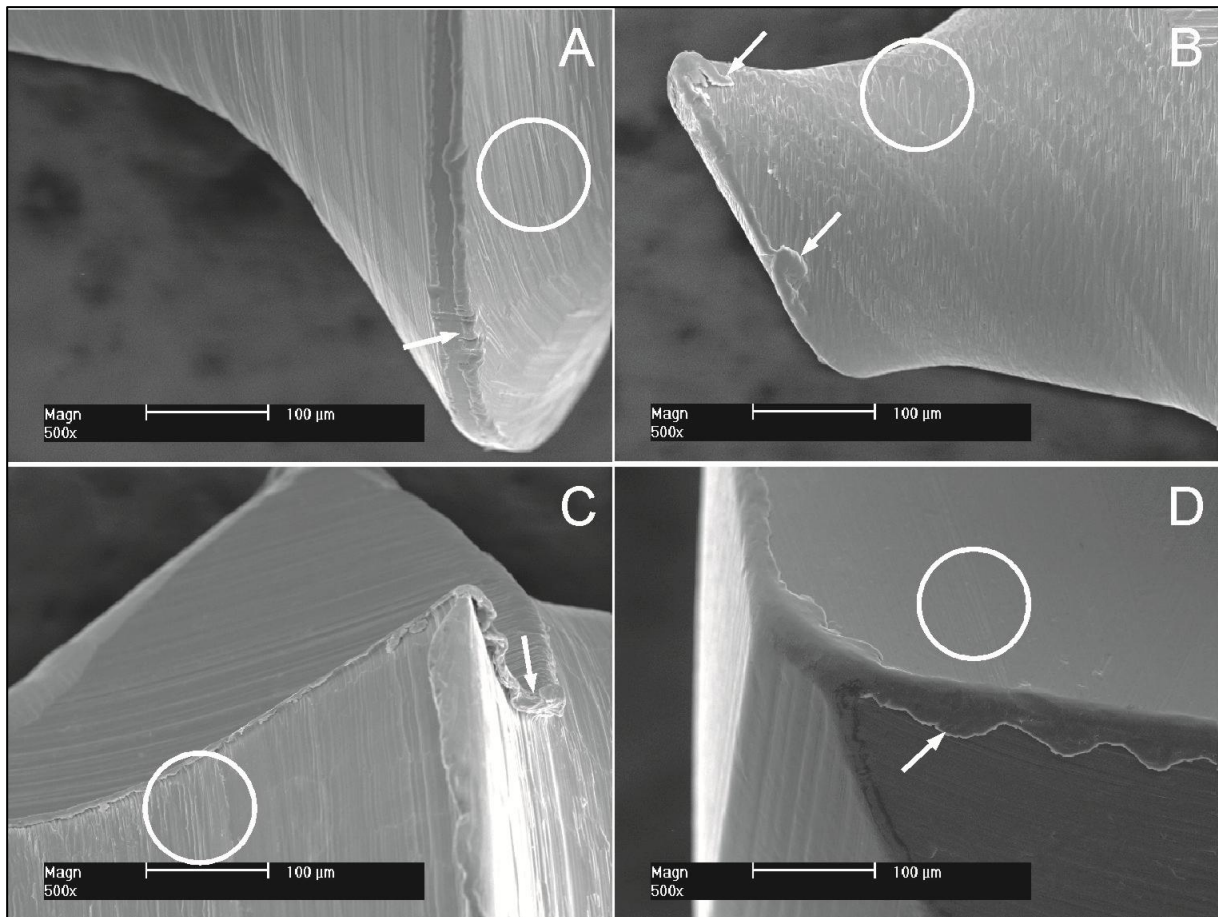


Abb. 15: Dual Top™

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Schraubenoberfläche nach Reinigung in Alkohol im Ultraschallbad zeigten leichte Rillen in fast allen Bereichen der Oberfläche des Dual Top™.

A: geringe Materialüberstände am Übergang der Schneide zur Flanke (**Pfeil**), leichte Rillen an der Flanke (**Kreis**)

B: Materialüberstände (**Pfeil**) und Oberflächenunebenheiten (**Kreis**) an der Spitze der Schraube

C: feine Rillen im Bereich der Kerbe an der Spitze (**Kreis**) und Materialüberstände an deren Rand (**Pfeil**)

D: Materialüberstände oder Ablagerungen an den Kanten im Bereich des Schraubenkopfes (**Pfeil**), glatte Oberfläche im restlichen Bereich des Schraubenkopfes (**Kreis**)

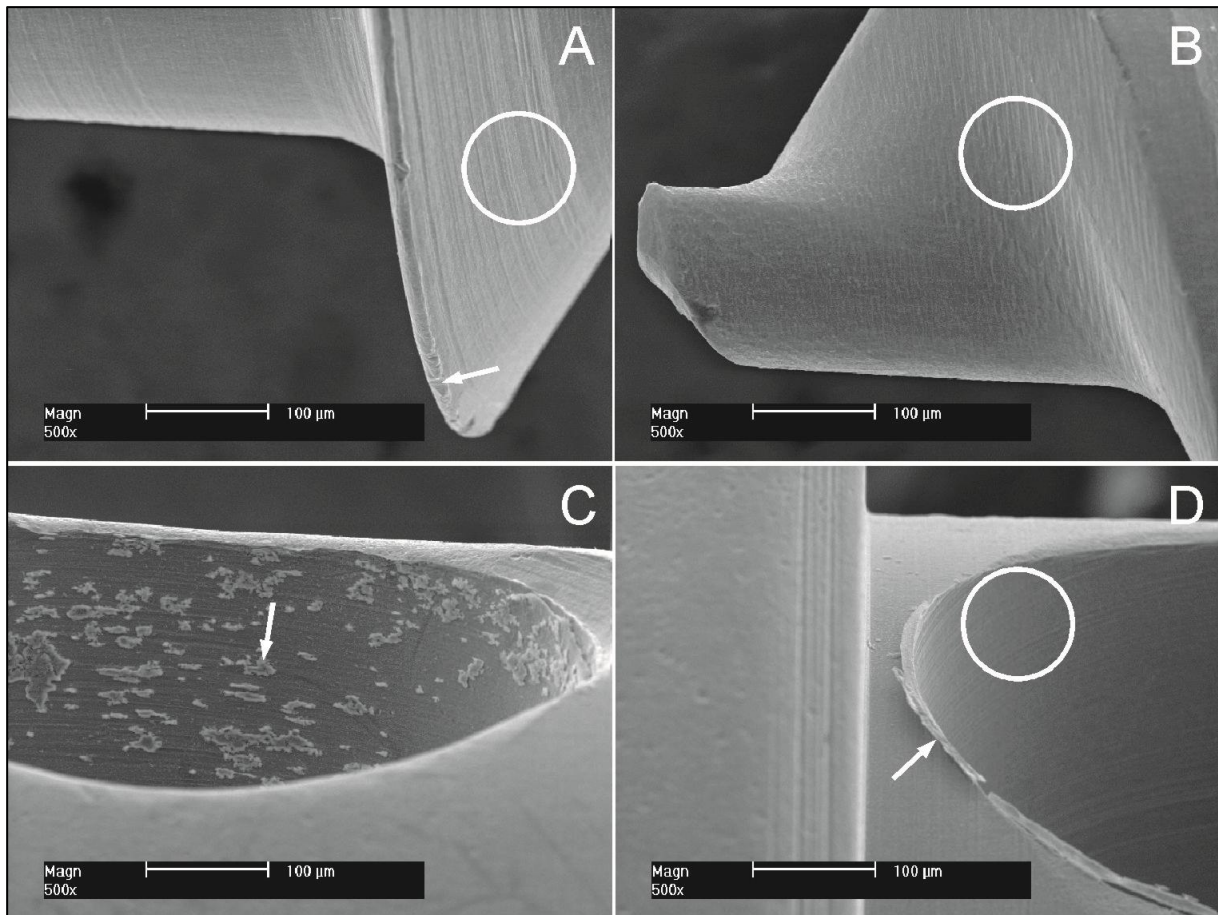


Abb. 16: LOMAS

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Schraubenoberfläche nach Reinigung in Alkohol im Ultraschallbad zeigten leichte Rillen in fast allen Bereichen der Oberfläche der LOMAS-Schraube. Außerdem fiel die schmale Schneide auf.

A: leichte Unebenheiten an der Schneide (**Pfeil**), leichte Rillen an der Flanke (**Kreis**)

B: Oberflächenunebenheiten an der Spitze der Schraube (**Kreis**)

C: Ablagerungen in der Bohrung am Kopf einzelner Schrauben (**Pfeil**)

D: Materialüberstände an den Kanten im Bereich des Kopfes einiger Schrauben (**Pfeil**), glatte Oberfläche im restlichen Bereich des Schraubenkopfes (**Kreis**)

3.2. Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die EDX-Analyse wurde an je 3 Messpunkten an 4 verschiedenen repräsentativen Stellen der Oberfläche von 5 Schrauben pro Typ durchgeführt und die gemessenen Werte gemittelt (entspricht n=60). Daraus ergaben sich für die oberflächlichen Schichten der Minischrauben folgende Bestandteile:

Tab. 1: Legierungsbestandteile Oberfläche

Herstellerangaben (DIN ISO 5832-3 bzw. ASTM F136) und gemessene Elemente mit EDX-Analyse jeweils in Gewichtsprozent; deutliche Abweichungen zu den Herstellerangaben sind hervorgehoben

| | Hersteller- angaben | EDX-Messung (jeweils Mw±SD) | | | |
|----|------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | | tomas®-pin | OrthoEasy® | Dual Top™ | LOMAS |
| Ti | Rest | 88,4 ± 1,9 | 88,8 ± 1,4 | 82,7 ± 1,6 | 83,2 ± 1,3 |
| Al | 5,5-6,75 / 5,5-6,5 | 7,5 ± 1,9 | 6,7 ± 1,4 | 13,3 ± 1,8 | 12,2 ± 1,1 |
| V | 3,5-4,5 | 3,4 ± 0,5 | 3,4 ± 0,3 | 3,5 ± 0,3 | 3,6 ± 0,1 |
| Fe | ≤ 0,3 / ≤ 0,2 | 0,5 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 |
| P | - | - | 0,4 ± 0,1 | - | 0,6 ± 0,2 |

An den Schnittflächen durchtrennter Schrauben (n=12) zeigte sich folgende Legierungszusammensetzung:

Tab. 2: Legierungsbestandteile Querschnitt

Herstellerangaben (DIN ISO 5832-3 bzw. ASTM F136) und gemessene Elemente mit EDX-Analyse jeweils in Gewichtsprozent; deutliche Abweichungen zu den Herstellerangaben sind hervorgehoben

| | Hersteller- angaben | EDX-Messung (jeweils Mw±SD) | | | |
|----|------------------------|-----------------------------|------------------|------------|-------------------|
| | | tomas®-pin | OrthoEasy® | Dual Top™ | LOMAS |
| Ti | Rest | 87,0 ± 1,3 | 87,7 ± 1,9 | 89,9 ± 1,6 | 86,7 ± 0,3 |
| Al | 5,5-6,75 / 5,5-6,5 | 9,9 ± 1,3 | 9,1 ± 2,0 | 6,7 ± 1,9 | 10,5 ± 0,2 |
| V | 3,5-4,5 | 2,7 ± 0,1 | 2,9 ± 0,2 | 3,2 ± 0,3 | 2,5 ± 0,1 |
| Fe | ≤ 0,3 / ≤ 0,2 | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 |
| P | - | - | - | - | - |

Beim OrthoEasy® und bei der LOMAS-Schraube wurde ein Peak bei ca. 2,15 keV abgebildet (Abb. 17 B, D), der auf Spuren von Phosphor hinweist, die deutlich oberhalb der Nachweisgrenze liegen. Dieser Peak lässt sich keinem der anderen gemessenen Elemente als Escape- oder Summationspeak zuweisen. An den Schnittflächen durchtrennter Schrauben waren keine Spuren von Phosphor messbar (Abb. 18).

Beim Dual Top™ und der LOMAS-Schraube wurden auf der Oberfläche erhöhte Werte für Aluminium gemessen (Tab. 1), die Werte für Vanadium überschneiden sich mit dem von den Herstellern bzw. in den Normen angegebenen Bereich. Die leicht erhöhten Eisenwerte lassen sich eher auf Messungenauigkeiten zurückführen, da ihr Ausmaß im Bereich der Schwankungen innerhalb eines Messpunktes liegt. Die Messungen am Querschnitt einer Schraube (Tab. 2) zeigten nur leicht erhöhte Aluminiumwerte, hier allerdings auch beim OrthoEasy® und beim tomas®-pin. An der Schnittfläche des Dual Top™ sind keine stark erhöhten Aluminium-Anteile messbar. Der Vanadium-Gehalt ist bei allen vier Schrauben an den Schnittflächen leicht herabgesetzt.

Die Messungenauigkeit wurde anhand von je 3 Messungen an 12 Stellen einer Schraube pro Hersteller beurteilt. Es wurde für jede Schraube für jedes gemessene Element der Mittelwert aus den 12 Standardabweichungen gebildet. Dabei zeigte sich eine mittlere Standardabweichung von 0,05-0,25 % als Messungenauigkeit, die bei der Beurteilung der gemessenen Legierungszusammensetzung berücksichtigt werden muss.

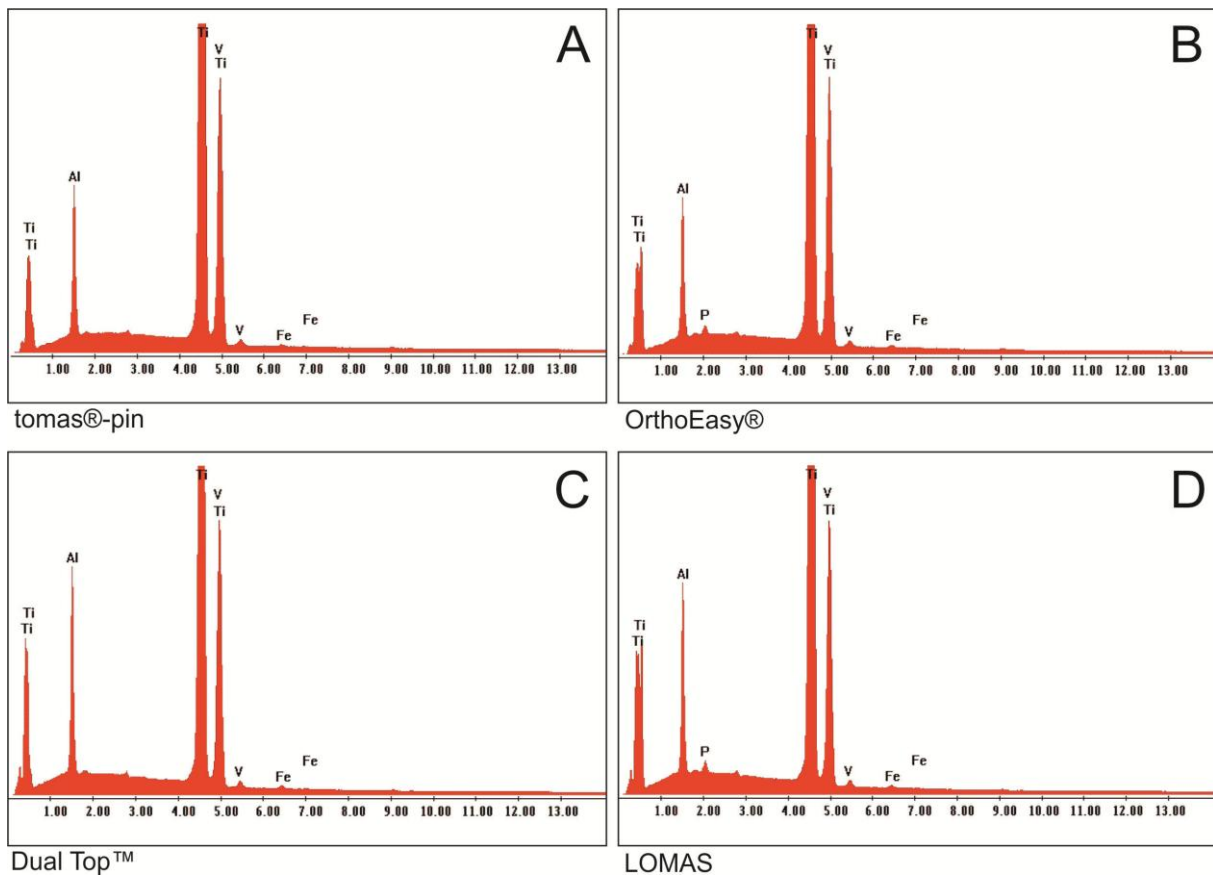


Abb. 17: EDX-Analyse der Legierungen an der Schraubenoberfläche

Alle Produkte zeigten ähnliche Titan-, Aluminium-, Vanadium- und Eisenanteile.

A: tomas®-pin

Die Legierung entspricht den Herstellerangaben.

B: OrthoEasy®

Ein Peak bei ca. 2,15 keV weist auf Phosphor hin.

C: Dual Top™

Erhöhter Aluminiumgehalt.

D: LOMAS

Erhöhter Aluminiumgehalt, ein Peak bei ca. 2,15 keV weist auf Phosphor hin.

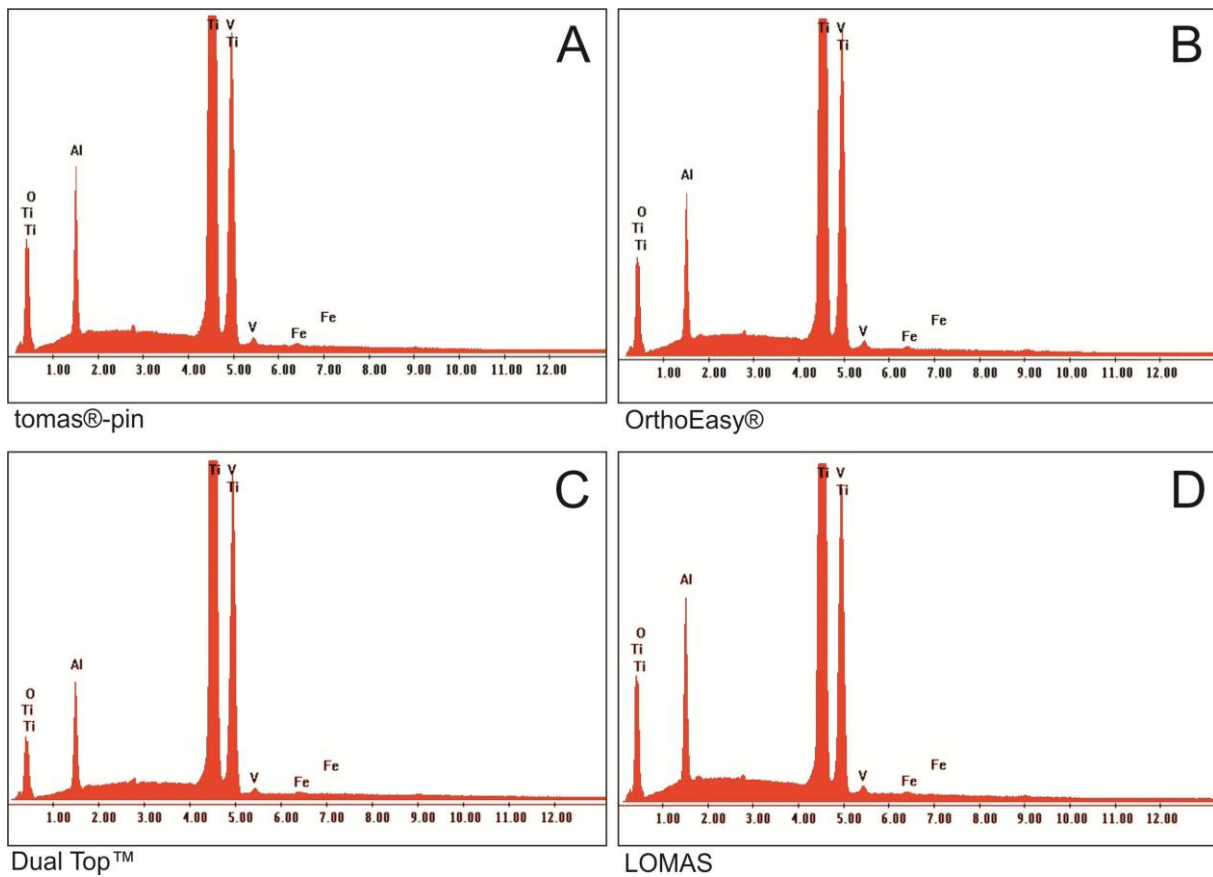


Abb. 18: EDX-Analyse der Legierungen am Querschnitt

Alle Produkte zeigten ähnliche Titan-, Aluminium-, Vanadium- und Eisenanteile, wobei der Aluminium-Peak beim Dual Top™ weniger ausgeprägt ist als bei den anderen drei Produkten.

Keine der Messungen lässt auf Rückstände von Phosphor schließen.

3.3. Quantitative Beurteilung der Zytotoxizität: MTT-Test

3.3.1. Direkter MTT-Test mit Fibroblasten

Nachdem die Fibroblasten 48 Stunden mit den Schrauben in direktem Kontakt gewesen waren, ergab die Messung der optischen Dichte mittels Photospektrometer signifikante Abweichungen zwischen einigen Schrauben und gegenüber der Negativkontrolle. Nach Kontakt mit der LOMAS-Schraube und dem OrthoEasy® Pin zeigten die Zellen eine signifikant höhere Vitalität als nach Kontakt mit den anderen beiden Produkten und bei der Negativkontrolle. Weiterhin war eine signifikant niedrigere Zellvitalität beim tomas®-pin im Vergleich zur Negativkontrolle messbar. Die Mittelwerte aller vier Produkte lagen in einem Bereich von $\pm 7\%$ um die Negativkontrolle.

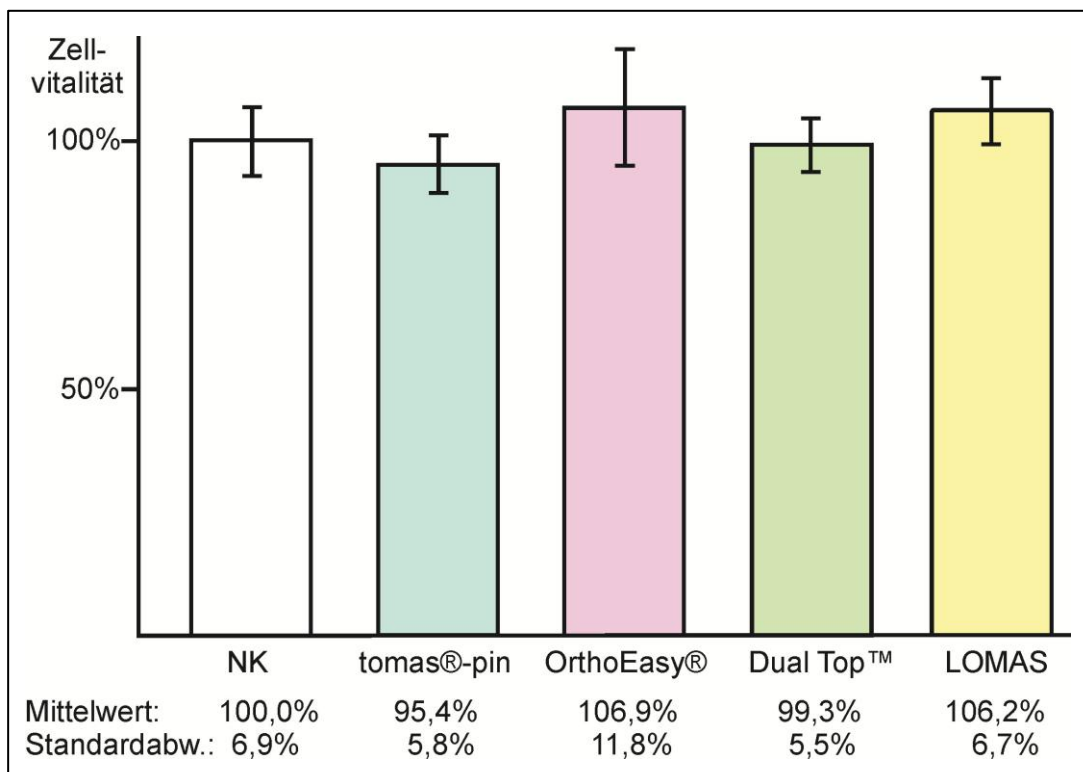


Abb. 19: Direkter MTT-Test, Fibroblasten

Zellvitalität in Prozent ($Mw \pm SD$) der Negativkontrolle nach Kontakt der Fibroblasten mit den Schrauben

3.3.2. Direkter MTT-Test mit Osteoblasten

Nach 48-stündigem Kontakt der Osteoblasten mit den Schrauben ergab die Messung der Zellvitalität eine signifikante ($p \leq 0,05$) Abweichung des tomas®-pins, des OrthoEasy® Pins und des Dual Top™ von der Negativkontrolle. Lediglich die Vitalität nach Kontakt mit der LOMAS-Schraube war vergleichbar mit der Negativkontrolle und signifikant höher als bei den anderen drei Produkten. Die Mittelwerte lagen in diesem Test alle in einem Bereich von $\pm 5\%$ um die Negativkontrolle.

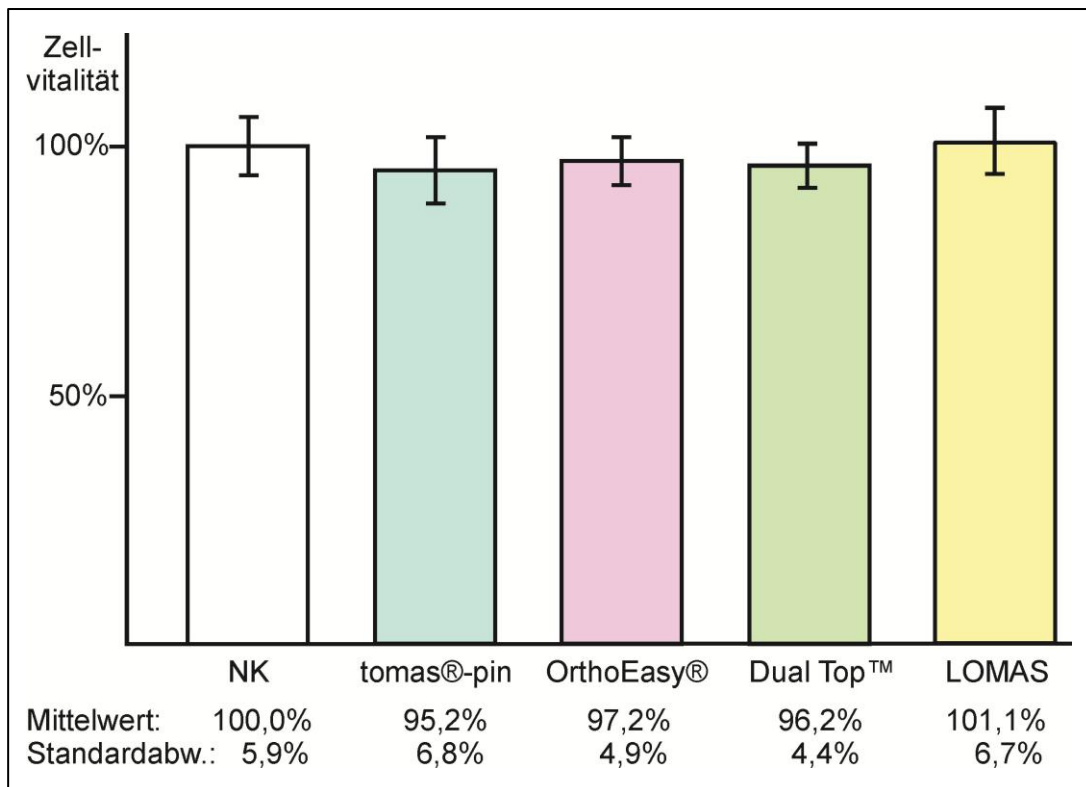


Abb. 20: Direkter MTT-Test, Osteoblasten

Zellvitalität in Prozent ($Mw \pm SD$) der Negativkontrolle nach Kontakt der Osteoblasten mit den Schrauben

3.3.3. Indirekter MTT-Test mit Fibroblasten

Nach dem Kontakt der Fibroblasten mit den Eluaten zeigten die Versuchsreihen des OrthoEasy® Pins und des Dual Top™ signifikant niedrigere Zellvitalitäten als die des tomas®-pins und die Negativkontrolle. Die Vitalität nach Kontakt mit dem Eluat des Dual Top™ war außerdem signifikant geringer als nach Kontakt mit dem Eluat der LOMAS-Schraube. Bei diesem Test lagen die Mittelwerte aller vier Produkte maximal 10 % unterhalb der Negativkontrolle.

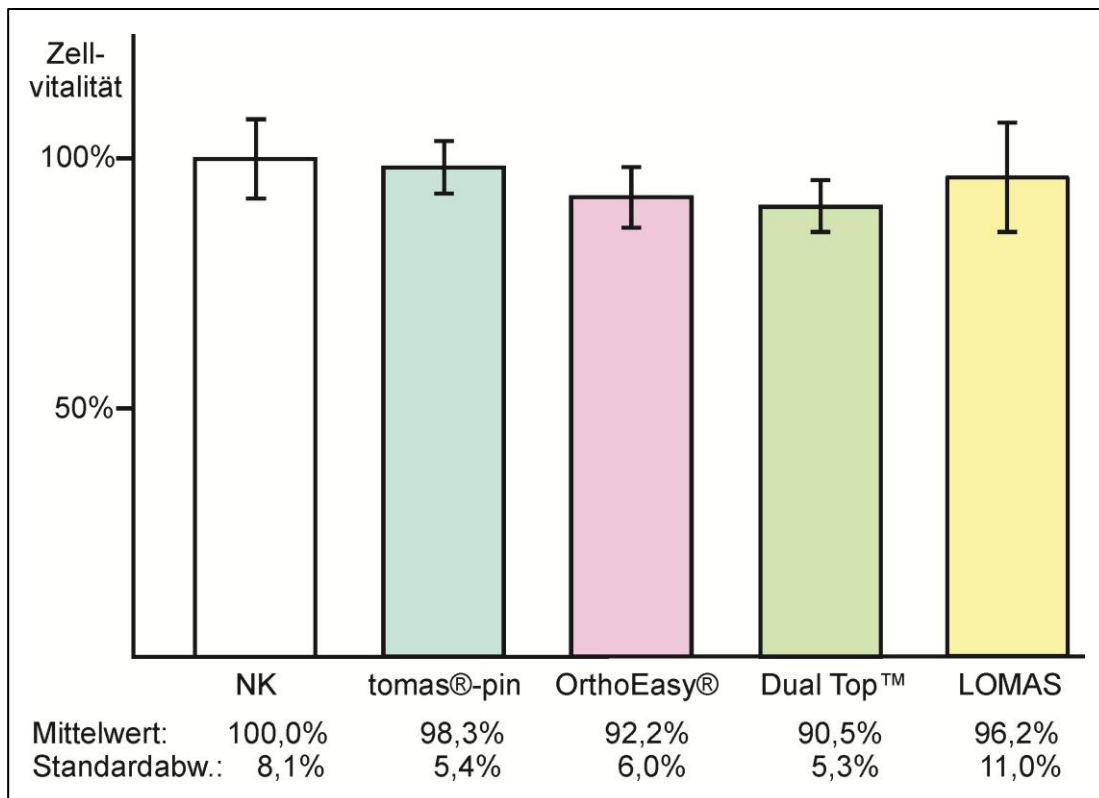


Abb. 21: Indirekter MTT-Test, Fibroblasten

Zellvitalität der Fibroblasten nach Kontakt mit den Eluaten der Schrauben in Prozent (Mw±SD) der Negativkontrolle

3.3.4. Indirekter MTT-Test mit Osteoblasten

Nach dem Kontakt der Osteoblasten mit den Eluaten war eine signifikant erhöhte Vitalität beim Eluat der LOMAS-Schraube im Vergleich zur Negativkontrolle zu sehen. Zwischen den anderen Produkten und zwischen diesen und der Negativkontrolle gab es keine signifikanten Abweichungen. Keines der vier Produkte verringerte die Zellvitalität im Vergleich zur Negativkontrolle.

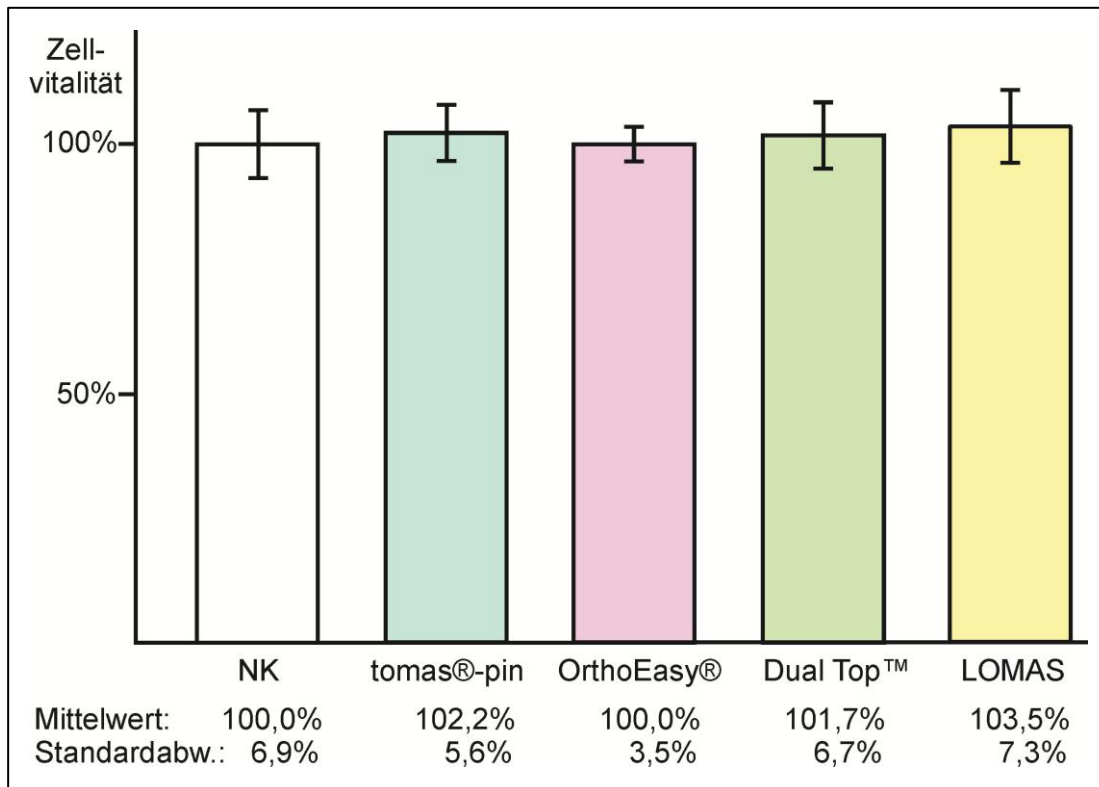


Abb. 22: Indirekter MTT-Test, Osteoblasten

Zellvitalität der Osteoblasten nach Kontakt mit den Eluaten der Schrauben in Prozent ($Mw \pm SD$) der Negativkontrolle

Bei den Positivkontrollen war die optische Dichte beider Zelllinien auf $\leq 5\%$ der Negativkontrolle herabgesetzt und entsprach damit der optischen Dichte des frischen und des konditionierten Mediums.

3.4. Qualitative Beurteilung der Zytotoxizität: Agar-Overlay-Test

3.4.1. Fibroblasten

Eluate/Schrauben:

Die Fibroblasten zeigten nach der Inkubation mit den Schrauben oder ihren Eluaten kaum Zellentfärbungen und keine Zellzerstörungen (Abb. 23). Lediglich ein ungleichmäßiges Wachstum war bei allen Versuchen in der Mitte der Vertiefung erkennbar. Dort erschienen die Zellen teilweise dichter gewachsen zu sein als in der Peripherie. Bei etwa der Hälfte der Eluate der LOMAS-Schraube war dieses verstärkte Zellwachstum in der Mitte der Vertiefung weniger ausgeprägt. Die Zellen waren unter dem Mikroskop betrachtet allerdings genauso stark gefärbt wie bei den anderen Eluaten (Abb. 23 G rechts). Unterhalb des Schraubenkopfes des OrthoEasy® waren einige punktförmige Entfärbungszonen (\varnothing je ca. 0,2 mm) erkennbar (Abb. 23 D links), unterhalb der Windung waren die Zellen aber unversehrt. Diese Entfärbungen zeigten sich bei 6 von 8 untersuchten Schrauben. Bei allen Vertiefungen waren im lichtmikroskopischen Bild unterhalb der Schrauben oder der eluatgetränkten Glasfaserplättchen vitale Zellen mit deutlich rot angefärbtem Zytoplasma zu sehen.

Kontrollen:

Bei den Positivkontrollen (Abb. 24 A, B) waren bereits makroskopisch Zellentfärbungszonen messbar (PK₁ \varnothing 10 mm, PK₂ \varnothing 8 mm, PK₃ 32 x 26 mm). Beide Negativkontrollen (Abb. 24 C, D) zeigten eine ähnliche Unregelmäßigkeit im Wachstum wie bei den Eluaten und den Minischrauben, wobei die NK₁ eine leichte Zellentfärbung unterhalb des Plättchens mit Medium vermuten ließ (Abb. 24 A). Diese Entfärbung hatte allerdings einen deutlich kleineren Durchmesser als das Glasfaserplättchen, sie ging also nicht über die Ausdehnung der Probe hinaus. Eine Zellzerstörung konnte nur bei der Positivkontrolle PK₃ direkt unterhalb des Kupferdrahts festgestellt werden (Abb. 24 E). Im mikroskopischen Bild erschienen die Zellmembranen bei den anderen beiden Positivkontrollen und auch peripher bei PK₃ erhalten. Die Färbung des Zytoplasmas war lediglich deutlich reduziert gegenüber den Proben und den Negativkontrollen.

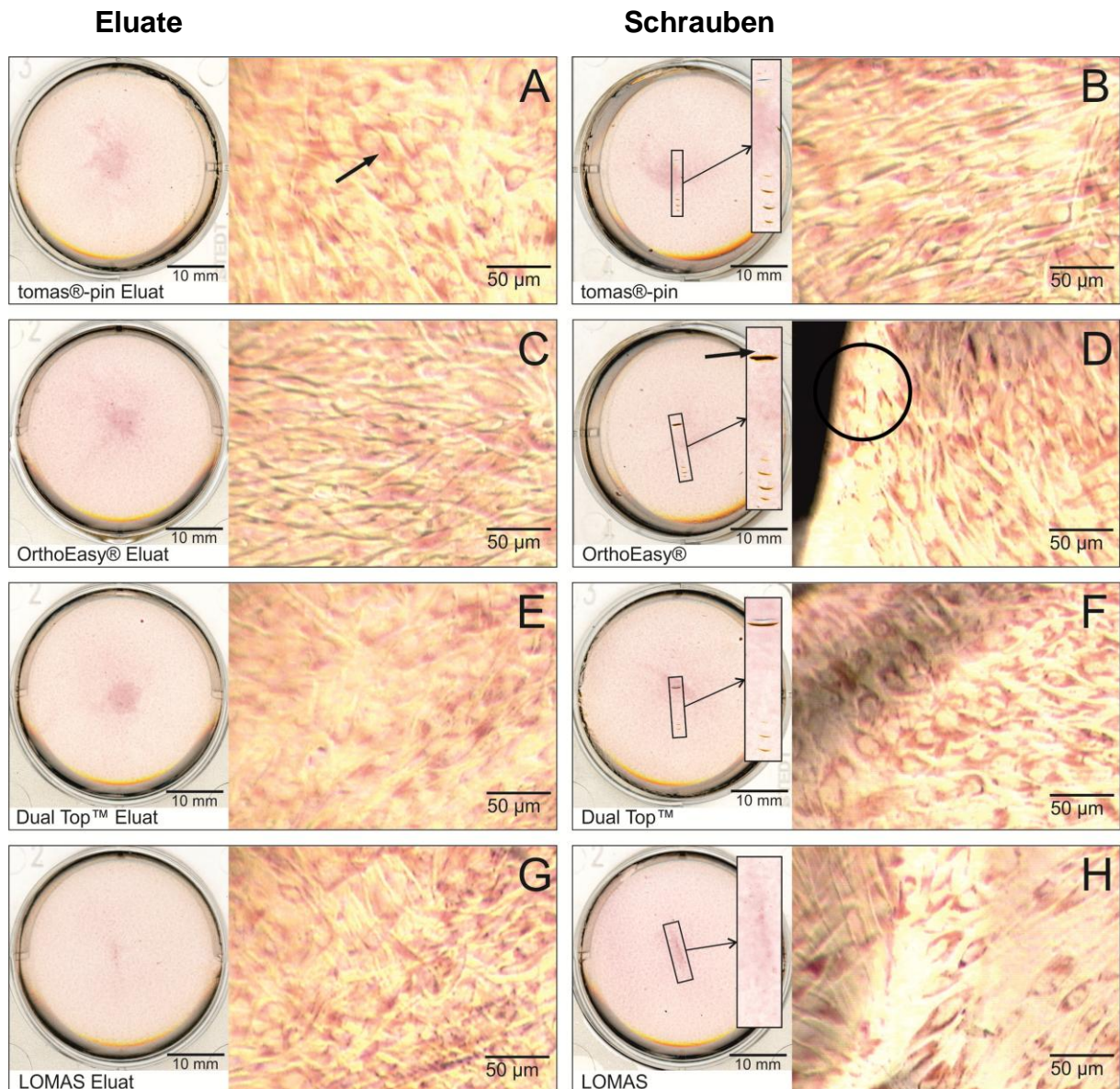


Abb. 23: Agar-Overlay Fibroblasten

Zustand der Zellen nach Vitalfärbung mit Neutralrot und 24-stündiger Inkubation mit den Eluaten (links) bzw. den Minischrauben (rechts). Die mikroskopischen Bilder wurden jeweils unterhalb der Probe gemacht. Die Ausschnitte zeigen jeweils die Bereiche des Agars, auf denen die Schrauben gelegen haben.

A, C, E, G: Vitale Zellen mit deutlich rot gefärbtem Zytoplasma (**Pfeil** in **A**) unterhalb der eluatgetränkten Glasfaserplättchen

B, F, H: Vitale Zellen unterhalb des tomas®-pin, des Dual Top™ und der LOMAS-Schraube; Reflektionen entstanden durch die Abdrücke der Gewinde im Agar

D: punktförmige Zellentfärbungszonen unterhalb des Kopfes des OrthoEasy® Pins (Ø je ca. 0,2 mm; **Pfeil**); Schatten (**Kreis**) entstanden durch die Abdrücke der Gewinde im Agar

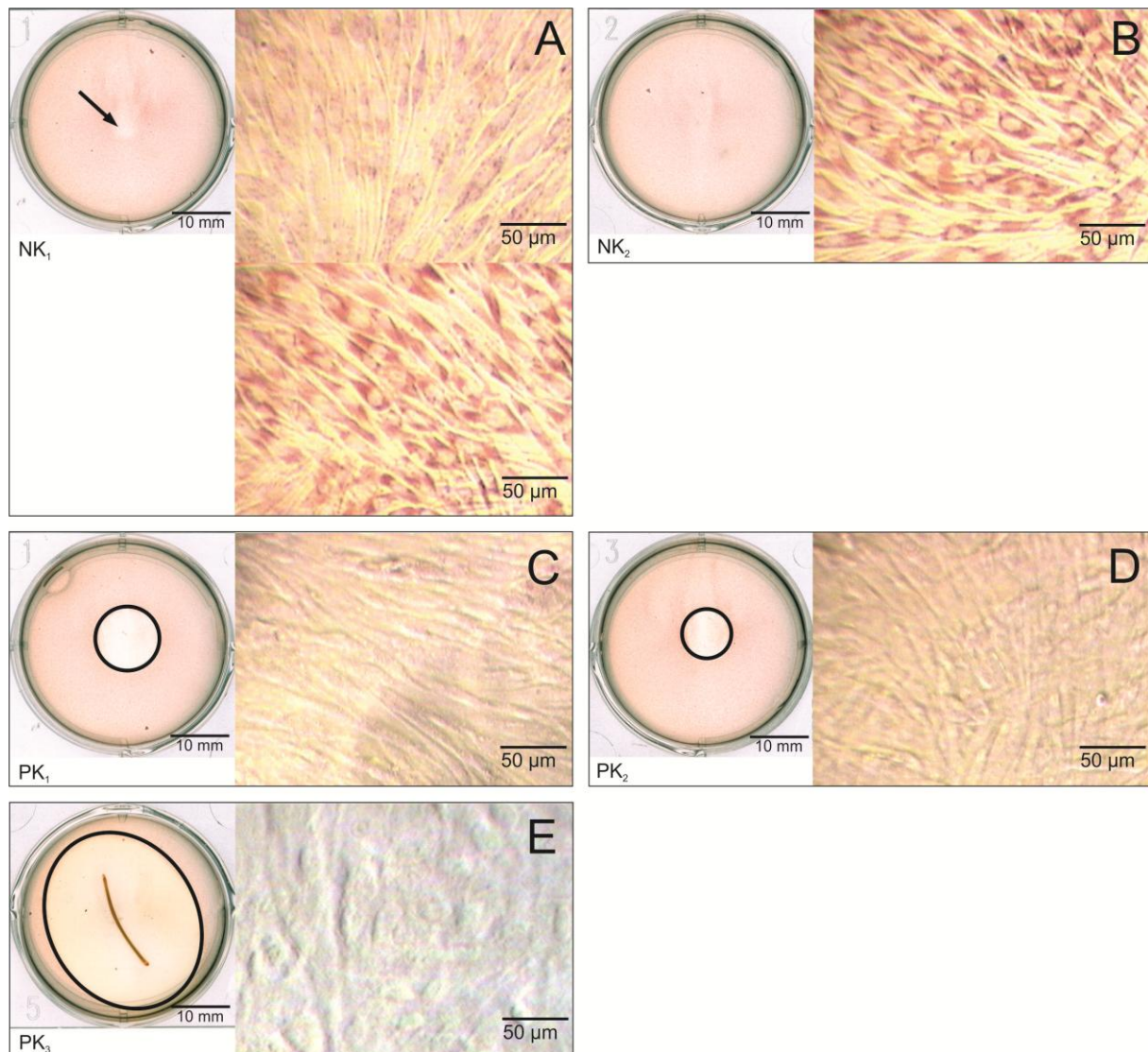


Abb. 24: Agar-Overlay Fibroblasten Kontrollen

Zustand der Zellen nach Vitalfärbung mit Neutralrot und 24-stündiger Inkubation mit den Negativ- (A, B) bzw. Positivkontrollen (C-E). Die mikroskopischen Bilder wurden jeweils unterhalb der Proben gemacht.

A: oben rechts: Im Bereich der leichten Zellentfärbung (**Pfeil**), einige Zellen weisen noch ein schwach gefärbtes Zytoplasma auf.

unten rechts: ebenfalls unterhalb der Probe außerhalb der Zellentfärbungszone

B: keine Zellentfärbung sichtbar, leichte Wachstums-Unregelmäßigkeiten in der Mitte der Vertiefung

C, D: deutliche Entfärbung (**Kreise**) des Zytoplasmas, keine Zellzerstörung erkennbar

E: deutliche Zellzerstörung sichtbar, keine Vitalfärbung unterhalb des Kupferdrahts mehr erkennbar

3.4.2. Osteoblasten

tomas®-pin:

Nach der Inkubation mit dem Eluat war bei einem Drittel der Vertiefungen makroskopisch eine leichte Entfärbung unterhalb des Glasfaserplättchens (Ø ca. 5 mm) zu sehen (Abb. 25 A).

Unterhalb des Schraubenkopfes war bei 6 von 8 Exemplaren makroskopisch eine leichte bis deutliche bis zu 1,8 x 1,3 mm große Entfärbungszone zu erkennen und zusätzlich bei 2 Schrauben leichte Entfärbungen unterhalb der Windungen (Abb. 25 B). Diese Entfärbungen waren allerdings im mikroskopischen Bild kaum erkennbar. Dort zeigten sich auch unterhalb des Schraubenkopfes deutlich rot gefärbte vitale Zellen.

OrthoEasy® Pin:

Die Osteoblasten zeigten auch hier bei etwa einem Drittel der Vertiefungen leichte Entfärbungen (Ø bis zu 4 mm) unterhalb der eluatgetränkten Plättchen (Abb. 25 C).

Nach der Inkubation mit der Schraube waren bei 6 von 8 Exemplaren unterhalb des Kopfes Zellentfärbungszonen von max. 2,2 x 2,3 mm zu sehen. Unterhalb des Gewindes waren die Zellen deutlich angefärbt (Abb. 25 D rechts).

Dual Top™:

Auch bei diesem Versuch konnte man bei einem Drittel der Vertiefungen dort eine leichte Zellentfärbung (Ø max. 4 mm) erkennen, wo das Glasfaserplättchen mit Eluat gelegen hatte (Abb. 25 E).

Unterhalb der Köpfe der Hälfte der Schrauben waren makroskopisch leichte Zellentfärbungen von bis zu 1,8 x 0,8 mm Größe erkennbar (Abb. 25 F).

LOMAS Schraube:

Unterhalb der eluatgetränkten Glasfaserplättchen zeigten sich bei der Hälfte der Vertiefungen leichte Zellentfärbungen (Ø max. 3 mm) (Abb. 25 G).

Allerdings war bei den Schrauben nur bei einem Exemplar eine leichte Zellentfärbung zu erkennen. Unterhalb der anderen 7 Schrauben waren die Zellen unversehrt (Abb. 25 H).

Keine der registrierten Entfärbungszonen ging über den Umriss der Probe hinaus.

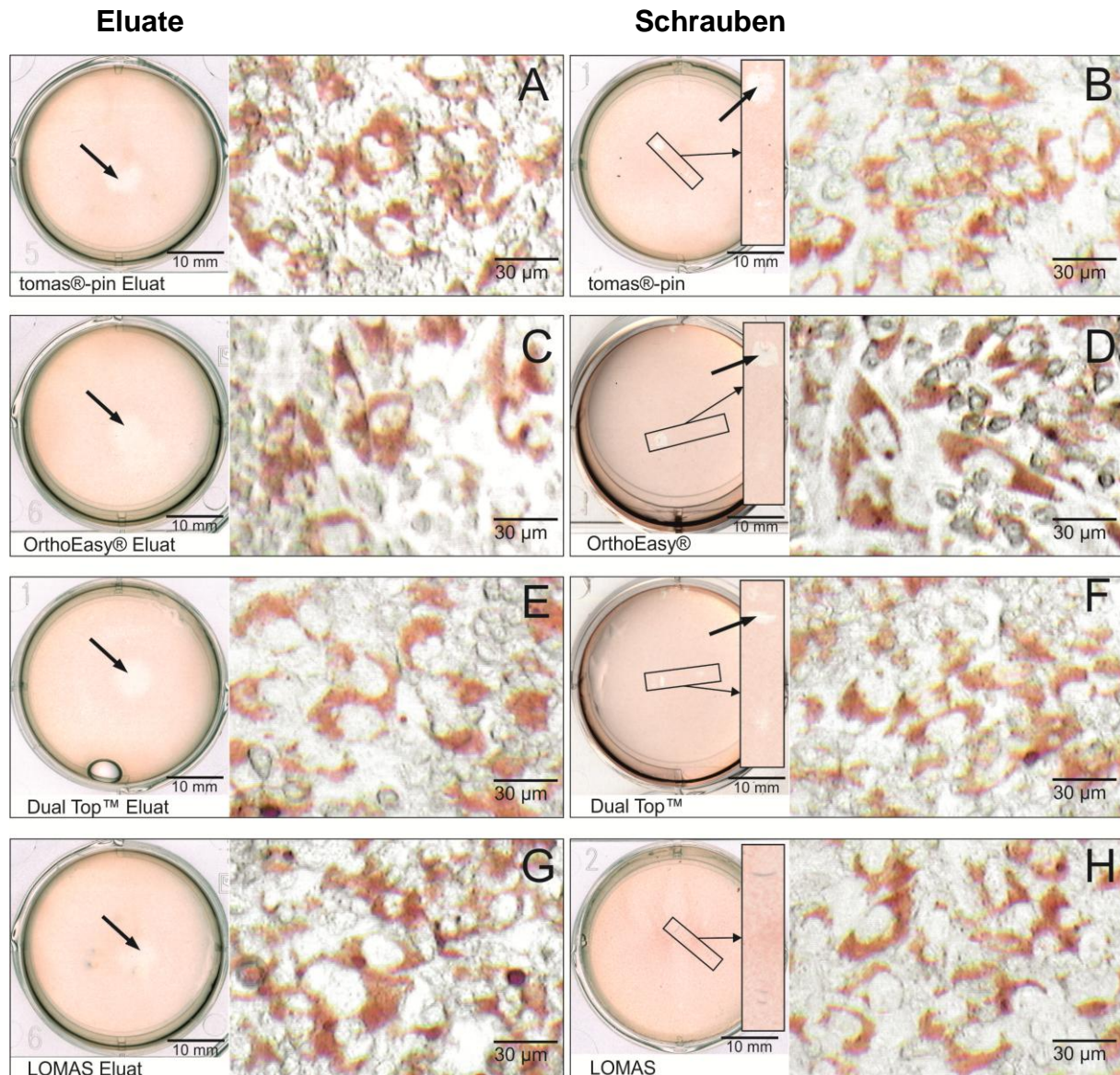


Abb. 25: Agar Overlay Osteoblasten

Zustand der Zellen nach Vitalfärbung mit Neutralrot und 24-stündiger Inkubation mit den Eluaten (links) bzw. den Minischrauben (rechts). Die mikroskopischen Bilder wurden jeweils unterhalb der Probe gemacht. Die Ausschnitte zeigen jeweils die Bereiche des Agars, auf denen die Schrauben gelegen haben.

A, C, E, G: Leichte Entfärbungen der Osteoblasten unterhalb der Eluat-Plättchen (**Pfeile**). Im mikroskopische Bild waren in allen Fällen vitale Zellen mit deutlich rot gefärbtem Zytoplasma erkennbar.

B, D, F: Zellentfärbungen unterhalb der Schraubenköpfe (**Pfeile**). Auch hier war im mikroskopischen Bild keine Korrelation zu den makroskopisch erkennbaren Entfärbungen erkennbar.

H: Vitale Zellen unterhalb der gesamten Schraube

Kontrollen:

Bei der Negativkontrolle NK₁ war eine leichte Zellentfärbung (Ø 3 mm), bei NK₂ keine Veränderung sichtbar (Abb. 26 A, B). Unter dem Mikroskop zeigte keine der Negativkontrollen deutlich abgrenzbare Entfärbungszonen. Die Positivkontrollen zeigten deutliche Entfärbungs- (PK₁ Ø 11 mm, PK₂ Ø 10 mm, PK₃ 28 x 25 mm) und Zerstörungszonen (PK₁ Ø 3 mm, PK₂ Ø 1 mm, PK₃ 15 x 2 mm) (Abb. 26 C-E). Die Zellzerstörung war bei PK₁ mikroskopisch am deutlichsten zu sehen und die verbliebenen Zellen waren stark entfärbt.

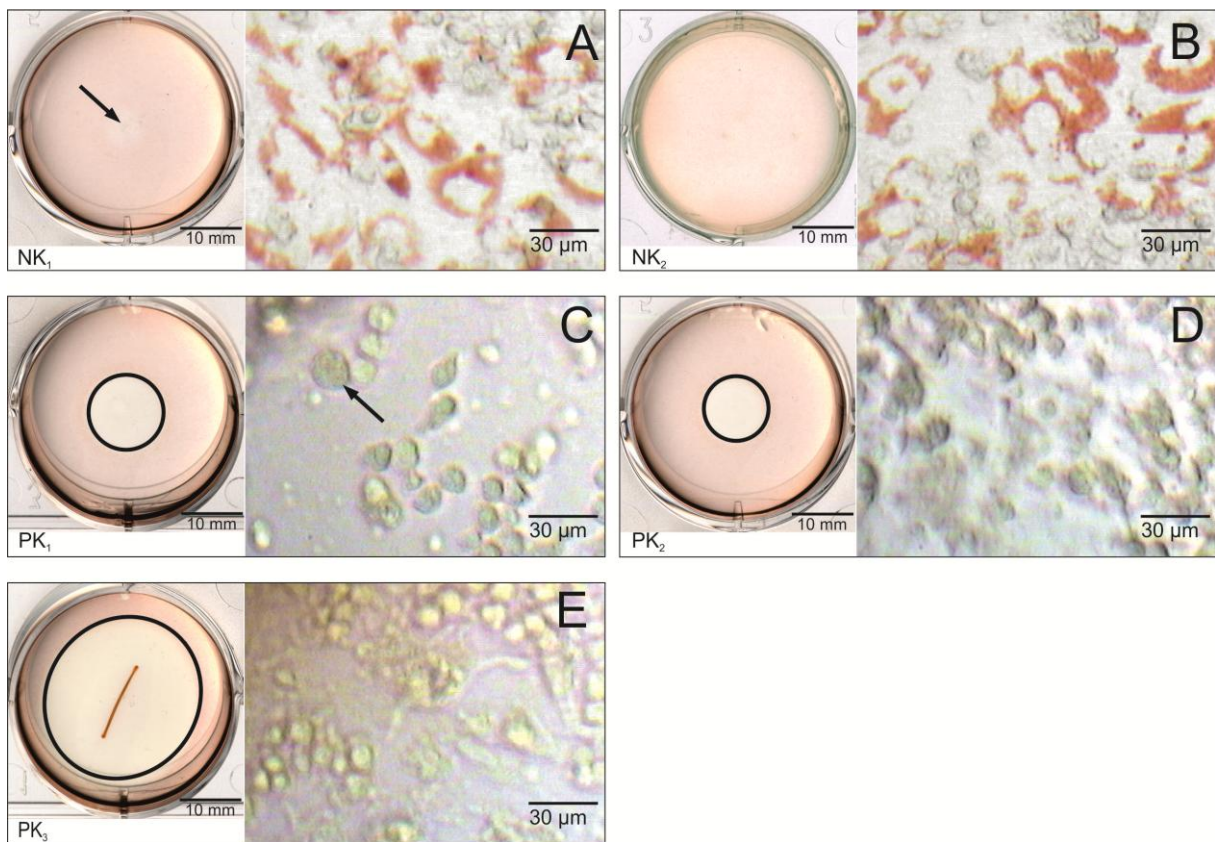


Abb. 26: Agar Overlay Osteoblasten Kontrollen

Zustand der Zellen nach Vitalfärbung mit Neutralrot und 24-stündiger Inkubation mit den Negativ- (A, B) bzw. Positivkontrollen (C-E). Die mikroskopischen Bilder wurden jeweils unterhalb der Probe gemacht.

- A:** Im Bereich der leichten makroskopisch sichtbaren Entfärbung (**Pfeil**) weisen die Zellen noch ein gefärbtes Zytoplasma auf.
- B:** keine Zellentfärbung sichtbar
- C, D, E:** deutliche Zellzerstörung sichtbar, die bei PK₁ am stärksten ausgeprägt ist (**Pfeil in C** zeigt einzelne kugelige, entfärbte Zellen); keine Vitalfärbung mehr erkennbar; **Kreise** markieren Zellentfärbungszonen

4. Diskussion

4.1. Bisherige Forschung

Mit kieferorthopädischen Minischrauben hat sich in den letzten Jahrzehnten eine Form der Verankerung etabliert, die einige neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnet. Bereits vor über 65 Jahren wurden die ersten Versuche an Hunden beschrieben, deren Ergebnisse allerdings noch keine Anwendung beim Menschen zuließen (Gainsforth und Highley, 1945). Etwa 40 Jahre später wurden Minischrauben bereits zu Testzwecken beim Menschen eingesetzt und erfolgreiche Zahnbewegungen durchgeführt (Creekmore und Eklund, 1983).

Die Zellverträglichkeit der heute in Deutschland für kieferorthopädische Minischrauben meist verwendeten Legierung TiAl6V4 wurde in mehreren Studien anhand von individuell hergestellten Probekörpern getestet und für gut befunden (Khosroshahi et al., 2009; Velasco-Ortega et al., 2010; Watanabe et al., 2004).

Die Verlustraten kieferorthopädischer Minischrauben über einen Behandlungszeitraum von 6-12 Monaten sind immer noch deutlich höher als die prothetischer Zahnimplantate über 5 Jahre (Crismani et al., 2010; Jung et al., 2008; Pjetursson et al., 2004; Schätzle et al., 2009). Klinische Studien liefern keine einheitlichen Begründungen dafür (Berens et al., 2005; Berens und Wiechmann, 2006; Fritz et al., 2004; Kneuert, 2009; Kuroda et al., 2007a; Kuroda et al., 2007b; Miyawaki et al., 2003; Park et al., 2006). Meist werden technische Parameter wie Schraubenlänge und -durchmesser oder die Lokalisation innerhalb der Kiefer als Einflussfaktoren diskutiert, die Ergebnisse der Studien widersprechen sich aber teils deutlich. Daher sollte in dieser Studie der Einfluss herstellungsbedingter Oberflächenveränderungen auf die Biokompatibilität untersucht werden. Außerdem wurde die eventuelle Zytotoxizität unterschiedlicher Produkte miteinander verglichen um Hinweise auf weitere mögliche Ursachen für Schraubenverluste unabhängig von technischen, Patienten- und Behandlerfaktoren zu erhalten.

4.2. Ergebnisse dieser Studie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten Unterschiede in der Oberflächenstruktur der Minischrauben. So waren bei allen Produkten geringe Materialüberstände oder Ablagerungen und Rillen erkennbar. Die Materialüberstände oder Ablagerungen könnten entweder Überschüsse der Schraubenlegierung selbst, Rückstände von Bearbeitungswerkzeugen oder aber Verunreinigungen anderer Herkunft sein, die durch die Reinigung nicht entfernt werden konnten. Rückstände von Bearbeitungswerkzeugen würden die Entstehung eines galvanischen Elements und damit eine Korrosion begünstigen, sofern es sich um andere chemische Bestandteile als die der Schraubenlegierung handelt. Die Oberfläche des tomas®-pins zeigte die geringsten Rillen an der Oberfläche, der OrthoEasy® Pin und die LOMAS-Schraube wiesen weniger Materialüberstände auf als die anderen beiden Produkte.

Die EDX-Analyse ergab – verglichen mit der angegebenen TiAl6V4-Legierung – einen leicht erhöhten Aluminiumgehalt im Bereich der untersuchten Oberflächenareale des Dual Top™ und der LOMAS-Schraube. Bei den EDX-Messungen an den Schnittflächen der Schrauben war der Aluminiumgehalt zwar auch etwas erhöht, allerdings nicht so stark wie an der Oberfläche. Allerdings war hier auch beim OrthoEasy® Pin und beim tomas®-pin ein erhöhter Aluminiumgehalt messbar. Der Dual Top™ hingegen zeigte keine so stark erhöhten Aluminiumanteile an den Schnittflächen wie an den gemessenen Oberflächenarealen. Ähnliche Abweichungen des Aluminiumgehalts zu den Herstellerangaben wurden ebenfalls von anderen Autoren für den tomas®-pin, den Dual Top™ und die LOMAS-Schraube (Reicheneder et al., 2008) bzw. für TiAl6V4-Proben (Jakobsen et al., 2007) beschrieben. Abweichungen der Legierungszusammensetzung von der DIN Norm in der in dieser Studie angegebenen Größenordnung sind dennoch ungewöhnlich. Produktionsfehler während der Fertigung dieser Medizinprodukte, z.B. das Überhitzen des Materials, das höhere Schwankungen in der Zusammensetzung erklären könnte, sind eher ausgeschlossen. Mögliche Erklärungen für diesen Sachverhalt bieten eventuell die Kalibrierung mit einem Aluminium-Kupfer-Standard anstatt eines TiAl6V4-Standards und ein Fehler beim Abzug des Untergrunds, vor allem im nichtlinearen Bereich. Eine weitere Erklärung für erhöhte Aluminium-

messungen an der Oberfläche von Titan-Aluminium-Legierungen wäre außerdem die unterschiedliche Oxidbildung der beiden Elemente: Da Titan zu TiO_2 oxidiert, Aluminium aber zu Al_2O_3 , wird bei der Oxidation pro Sauerstoff-Atom mehr Aluminium als Titan in der Oberfläche gebunden. Dadurch könnten an freiliegenden Oberflächen schon nach kurzer Oxidationszeit leicht erhöhte Aluminiumwerte messbar sein, wenn der Sauerstoffanteil herausgerechnet wird. Allerdings lassen sich dadurch keine Erhöhungen von 6 % auf 9 % erklären, wenn der Sauerstoffanteil an der Oberfläche zum Zeitpunkt der Messung mit ≤ 2 % angegeben wurde. Zudem ist bei einer Spannung von 25 kV wie bereits im Methoden-Abschnitt beschrieben von einer Eindringtiefe von ca. 1 μm auszugehen. Oxidschichtdicken um 100 nm können aber kaum verantwortlich gemacht werden für die weiter oben beschriebenen Schwankungen der Zusammensetzung. Da Aluminium aber weder zytotoxische Effekte hat (Elshahawy et al., 2009; McKay et al., 1996; Wataha et al., 1994) noch eine leichte Erhöhung sich stabilitätsmindernd auf Titan-Legierungen auswirkt (Germann et al., 2005; Nandy et al., 1995), ist nicht von einer Qualitätsminderung des Produkts durch einen erhöhten Aluminiumgehalt auszugehen. Abgesehen von den genannten Legierungsbestandteilen und Spuren allgegenwärtiger Elementen wie Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff wurden beim OrthoEasy® Pin und bei der LOMAS-Schraube Spuren von Phosphor gemessen. Bei den betreffenden Schrauben wurde die Oberfläche nach der Herstellung durch Anodisierung „eingefärbt“. Auf der Schnittfläche durchtrennter Schrauben war allerdings kein Phosphor, sondern nur die vom Hersteller angegebenen Elemente nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem gemessenen Phosphor um Rückstände des Anodisierungsprozesses handelt. Diese Anodisierung wird mit Hilfe von z. B. H_2SO_4 - oder H_3PO_4 -Elektrolyten durchgeführt, deren Rückstände an der Oberfläche messbar sein können (Liu et al., 2004; Widmer, 1998). Das Vorliegen von Phosphor an der Oberfläche der Schrauben hat allerdings keine negativen Effekte auf die Biokompatibilität. Einige Autoren haben sogar Titanoberflächen mit Phosphor und Calcium angereichert um die Osseointegration von Titanimplantaten zu verbessern (Ishizawa et al., 1995; Zhu et al., 2002). Erhöhte Messergebnisse von Sauerstoff an der Oberfläche von Titanlegierungen sind zu erwarten, da sich dort eine Titanoxid-Schicht bildet.

Da ein Einfluss des Zelltyps auf die Ergebnisse von Zytotoxizitätstests beschrieben wurde (Johnson et al., 1983; Souid-Mensi et al., 2008; Wataha et al., 1994), wurden für die vorliegende Studie Zellen verwendet, die die angrenzenden Gewebe im Patientenmund möglichst gut repräsentieren. Primäre humane Gingivafibroblasten sollten Hinweise auf die Reaktion des Bindegewebes und eine etablierte Osteoblastenzelllinie auf die des Knochens geben. Die verwendete permanente Zelllinie SAOS-2 wurde bereits in vielen in-vitro-Studien zur Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten auf Titanoberflächen (Fassina et al., 2007; Klinger et al., 2011) und deren Reaktion auf diverse andere Stoffe verwendet (Akasaka et al., 2009; Hempel et al., 2010). Aus diesem Grund wurde sie für die vorliegende Studie als geeignet befunden.

Die Ergebnisse der MTT-Tests zeigten Unterschiede in der Biokompatibilität der einzelnen Schraubentypen. Eine eindeutige Tendenz war nur bei der LOMAS-Schraube zu erkennen, die in allen MTT-Tests vergleichbar mit der Negativkontrolle war. Die Differenzen der anderen Schrauben zur Negativkontrolle waren in allen 4 Tests unterschiedlich stark ausgeprägt und eine Rangfolge der 3 Produkte in ihrer Zytotoxizität nicht eindeutig feststellbar. Der tomas®-pin war beispielsweise bei den Tests mit Osteoblasten vergleichbar mit der Negativkontrolle, die Vitalität der Fibroblasten war nach Kontakt mit dieser Schraube oder ihrem Eluat allerdings leicht herabgesetzt. Der OrthoEasy® Pin und der Dual Top™ zeigten dagegen eine leicht herabgesetzte Biokompatibilität im direkten Test mit Osteoblasten und im indirekten Test mit Fibroblasten, in den anderen beiden Tests waren die Werte aber vergleichbar mit der Negativkontrolle oder sogar besser. Neben der Freisetzung zytotoxischer Ionen oder der Entstehung eines galvanischen Elements käme eine Schädigung der Zellen durch das Gewicht der Schrauben ebenfalls als Ursache für eine herabgesetzte Zellvitalität in Frage. Allerdings wäre dann auch eine geringere Beeinträchtigung durch den Dual Top™ zu erwarten, der mit 74 mg die leichteste der vier Schrauben ist.

Laut der ISO-Norm 10993-5 (Deutsches Institut für Normung e. V., 2009) ist bei der quantitativen Auswertung ab einer Herabsetzung der Zellvitalität von >30 % von einem zytotoxischen Effekt der untersuchten Probe auszugehen. Die im vorliegenden Versuch gemessenen Werte liegen alle mit max. 10 % deutlich unterhalb dieser

Grenze. Daher sollte keines der untersuchten Produkte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als zytotoxisch bezeichnet werden.

Im Agar-Overlay-Test zeigten die Fibroblasten kaum Beeinträchtigung durch die Minischrauben oder deren Eluate. Bei den Osteoblasten waren bei einigen Exemplaren des tomas®-pins, Dual Top™ und OrthoEasy® Pins sowohl unterhalb des Eluat-Plättchens als auch unterhalb des Schraubenkopfes Zellentfärbungen sichtbar. Diese Beeinträchtigungen der Zellen gingen aber in keinem Versuch über die Ausdehnung der Probe hinaus, was darauf schließen lässt, dass eventuell abgegebene Ionen nicht in die weitere Umgebung diffundieren oder die verminderte Zellvitalität andere Gründe als zytotoxische Ionen hat. Denkbar wäre eine Behinderung der Gasdiffusion im Agar durch die aufgelegten Proben oder eine Beeinträchtigung durch das Gewicht der Schrauben. Die Entfärbungen waren jeweils nach Inkubation mit den Schrauben deutlicher als nach Inkubation mit den Eluaten. Dies spricht eher für eine direkte Ionenabgabe oder das Gewicht der Schrauben, da die Eluatplättchen eine größere Fläche des Agars bedeckten und damit die Gasdiffusion stärker vermindert hätten als die Minischrauben. Die LOMAS-Schraube, die mit ca. 96 mg zu den leichteren gehört, erzeugte als einzige keine Zellentfärbung oder -zerstörung nach direkter Inkubation, allerdings war bei ihrem Eluat ebenfalls eine leichte Entfärbung der Osteoblasten sichtbar. Laut der ISO-Norm 10993-5 (Deutsches Institut für Normung e. V., 2009) sollte eine Probe erst als zytotoxisch bezeichnet werden, wenn bei der qualitativen Auswertung über 50 % der Zellen deutliche Beeinträchtigungen zeigen und/oder die Zellentfärbung über die Ausdehnung der Probe hinausgeht. Dies war bei keiner der untersuchten Proben der Fall. Die Negativkontrollen NK₁ zeigten bei beiden Zelltypen leichte Zellentfärbungen, die Positivkontrollen deutliche Entfärbungen und bei den Osteoblasten und PK₃ der Fibroblasten auch Zerstörungen der Zellen. Aufgrund der Zellentfärbungen bei beiden Negativkontrollen NK₁ kann von einem negativen Einfluss des Glasfaserplättchens auf das Zellwachstum ausgegangen werden. Dies wiederum relativiert die Entfärbung der Osteoblasten unterhalb der eluatgetränkten Plättchen, erklärt aber nicht dessen Fehlen bei den Fibroblasten. Außerdem sollte beachtet werden, dass die deutlichen Beeinträchtigungen der Osteoblasten fast ausschließlich unter den Schraubenköpfen auftraten, sie aber in vivo nur mit dem Gewinde und Teilen des Halses in Kontakt kommen.

Da die Nutzung unterschiedlicher Testverfahren für die Zytotoxizitätsmessung von Materialien empfohlen wird (Saw et al., 2005; Souid-Mensi et al., 2008), wurden für die vorliegende Arbeit der MTT-Test und der Agar-Overlay-Test gewählt. Die quantitative Beurteilung der Zytotoxizität mit MTT wurde seit ihrer Entwicklung (Mosmann, 1983) nur wenig modifiziert und zählt zu den etablierten Methoden bei der Zellvitalitätsmessung. Sie wurde wie auch der Agar-Overlay-Test mit Neutralrotfärbung bereits in vielen in-vitro-Studien zur Beurteilung der Biokompatibilität von Werkstoffen und Materialien eingesetzt (Di Virgilio et al., 2010; Es-Souni et al., 2003; Sjögren et al., 2000; Velasco-Ortega et al., 2010). Weitere Möglichkeiten zur Zytotoxizitätsmessung hätten beispielsweise die Trypanblau-Färbung und der Laktatdehydrogenase-Freisetzungstest dargestellt. Erstere färbt die toten Zellen direkt an, Trypanblau wirkt aber selbst zytotoxisch (Louis und Siegel, 2011; Sarma et al., 2000), daher muss die Auswertung deutlich schneller ablaufen als bei den verwendeten Methoden. Der LDH-Test misst die Aktivität der aus lysierten Zellen freigesetzten Enzyme, ist aber für die Biokompatibilitätsbeurteilung weniger geeignet als der MTT- und der Agar-Overlay-Test (Fotakis und Timbrell, 2006). Da der LDH-Test und die Trypanblau-Färbung Auskunft über abgestorbene Zellen geben, in der vorliegenden Studie aber nicht von starken Beeinträchtigungen der Zellvitalität auszugehen war, wurden dem MTT-Test und dem Agar-Overlay-Test der Vorzug gegeben. Andere Tetrazoliumsalze wie WST-1 (Huhtala et al., 2003) hätten ebenfalls genutzt werden können, allerdings wären dadurch keine weiteren Erkenntnisse zusätzlich zu den Ergebnissen des MTT-Tests zu erwarten gewesen.

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse fiel auf, dass der tomas®-pin die glatteste Oberfläche aufwies und die Zusammensetzung der Legierung am ehesten den Herstellerangaben entsprach. Die LOMAS-Schraube, die im Zytotoxizitätstest die besten Ergebnisse zeigte, ließ im Rasterelektronenmikroskop leichte Materialüberstände bzw. Ablagerungen erkennen und die Zusammensetzung an der Oberfläche wich leicht von der angegebenen TiAl6V4-Legierung ab. Zusätzlich besitzt diese Schraube von den getesteten vier Produkten die größte makroskopisch messbare Oberfläche (114 mm^2). Titan wird meist als sehr biokompatibel (Sjögren et al., 2000) und korrosionsbeständig im Kontakt mit künstlichem Speichel beschrieben (Schiff et al., 2002; Strietzel et al., 1998). Da auch die Beurteilung von Aluminium von nicht-zytotoxisch (Elshahawy et al., 2009; Wataha et al., 1994) bis wachstums-

stimulierend (McKay et al., 1996) geht, waren vermutlich andere Bestandteile der Schraube oder Verunreinigungen für die Unterschiede in der Biokompatibilität verantwortlich. Die Oberflächenbeschaffenheit einer metallischen Probe wurde bereits in mehreren Studien mit der Biokompatibilität bzw. der Ionenabgabe in ein flüssiges Medium in Verbindung gebracht. Hier wurde meist eine saubere, homogene und glatte Oberfläche für besser befunden (Craig und Hanks, 1988; Es-Souni et al., 2002; Giordano et al., 2004; Velasco-Ortega et al., 2010). Zwar wurde bei einer hochgoldhaltigen Legierung letztlich eine höhere Zellvitalität bei raueren Oberflächen festgestellt (Altvater et al., 2000) und das Wachstum einer Osteoblasten-Zelllinie war auf raueren TiAl6Nb7-Oberflächen stärker als auf glatten (Osathanon et al., 2011). Diese Effekte lassen sich aber nicht auf den Agar-Overlay-Test übertragen, da die Legierung dort nicht direkt mit den Zellen in Kontakt kommt. Außerdem waren die Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der Schrauben so gering, dass sie keine Rückschlüsse auf das Ausmaß der Oberflächenvergrößerung zulassen. Um eine Korrelation zwischen der Oberflächenrauigkeit und der Zellvitalität zu beurteilen, wären ein direkter Kontakt der Zellen mit den Schrauben und eine genaue Messung der Oberfläche notwendig gewesen, die im Studienaufbau nicht vorgesehen waren. Falls es eine Korrelation zwischen der Biokompatibilität und der Oberflächenbeschaffenheit, -größe und -zusammensetzung geben sollte, dann waren ihre Auswirkungen in den vorliegenden Ergebnissen nicht feststellbar.

4.3. Schlussfolgerungen

Die eingangs gestellten Fragen konnten beantwortet werden. Eine Herabsetzung der Zellvitalität durch kieferorthopädische Minischrauben war in geringem Maße in-vitro nachweisbar und es zeigten sich minimale Unterschiede zwischen den getesteten Produkten. Der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf das Zellwachstum kann als gering angesehen werden.

Keines der Testergebnisse spricht gegen den Einsatz eines der Produkte, da die Abweichungen von den Negativkontrollen meist so klein sind ($<10\%$), dass sie zwar als statistisch signifikant angesehen werden können, aber deutlich unterhalb der laut ISO-Norm 10993-5 (Deutsches Institut für Normung e. V., 2009) angegebenen Grenze von 30% liegen, oberhalb derer zytotoxische Effekte beschrieben werden könnten.

Außer den vom Hersteller angegebenen Elementen wurde an der Oberfläche der Schrauben nur Phosphor gemessen und für dieses Element wurden weder zytotoxische Effekte beschrieben noch zeigte sich in dieser Studie ein negativer Einfluss des Phosphors auf die Biokompatibilität. Da TiAl6V4 eine häufig untersuchte und als sehr biokompatibel beschriebene Legierung ist (Faria et al., 2009; Faria et al., 2008; Gallardo-Moreno et al., 2009; Hoffmann et al., 2005; Jakobsen et al., 2007; Khosroshahi et al., 2009; Koike et al., 2007; Scharnweber et al., 2002; Velasco-Ortega et al., 2010; Watanabe et al., 2004), ist nicht von einer Beeinträchtigung der Zellen durch freigesetzte Ionen auszugehen. Ob das Gewicht der Schrauben oder andere Faktoren für die Beeinträchtigungen der Zellen in den Zytotoxizitätstests verantwortlich waren, lässt sich anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht entscheiden.

Um in nachfolgenden Studien eine direkte Korrelation zwischen der Oberflächenbeschaffenheit und der Verlustrate der Minischrauben herzustellen, müsste eine in-vivo-Studie mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Schrauben vor und nach der Anwendung durchgeführt werden. Außerdem wäre eine Untersuchung unterschiedlicher Chargen bezüglich der Oberflächenbeschaffenheit und der Biokompatibilität nützlich, die bei größeren Stückzahlen eventuelle Unterschiede zwischen Schrauben desselben Typs darstellt.

5. Zusammenfassung

Kieferorthopädische Minischrauben stellen eine zahnunabhängige Verankerungsmöglichkeit in der kieferorthopädischen Behandlung dar, die in den letzten Jahrzehnten entwickelt und etabliert wurde. Trotz diverser klinischer Studien konnten die Misserfolgsgründe nicht abschließend geklärt werden. Daher sollten in der vorliegenden Studie Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit und deren eventuelle Auswirkungen auf die Biokompatibilität in vitro untersucht und ein Vergleich verschiedener Minischrauben bezüglich ihrer Zytotoxizität vorgenommen werden.

Es wurden vier verschiedene Produkte vergleichbarer Größe getestet: Der tomas®-pin (Dentaurum), der OrthoEasy® Pin (Forestadent®), der Dual Top™ (Jeil Medical/Promedia) und die LOMAS-Schraube (Mondeal®). Um Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit zu erkennen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Schrauben angefertigt. Hier zeigten alle vier Produkte Materialüberstände oder Ablagerungen, große Unterschiede zwischen den Schrauben konnten aber nicht festgestellt werden. Die Legierungszusammensetzung wurde mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie an der Oberfläche und an Schnittflächen der Schrauben ermittelt, wobei bei allen Produkten leichte Abweichungen zu den Herstellerangaben messbar waren. Die verwendeten Zellkulturen für die Biokompatibilitätstests wurden im Hinblick auf die Kontaktgewebe in vivo ausgewählt: eine primäre humane Fibroblasten- und eine etablierte Osteoblastenzelllinie. Als Proben dienten einerseits die Minischrauben selbst, andererseits Nährmedium, das 72 h mit den Minischrauben inkubiert worden war. Zur quantitativen Beurteilung wurde die enzymatische Reduktion von MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazoliumbromid) in vitalen Zellen gemessen. Hier zeigten alle Schrauben außer der LOMAS-Schraube minimale Herabsetzungen der Zellvitalität, die aber aufgrund ihres geringen Ausmaßes nicht als relevant angesehen werden können. Zur qualitativen Beurteilung der Zellvitalität wurde ein Agar-Overlay-Test mit Neutralrot-Färbung der vitalen Zellen durchgeführt. Dabei zeigte die LOMAS-Schraube die geringste Beeinträchtigung der Zellvitalität, der tomas®-pin, der OrthoEasy® Pin und der Dual Top™ verursachten leichte Zellentfärbungen, die aber nicht über den Umriss der Schraube hinausgingen.

Trotz geringerer Oberflächenunregelmäßigkeiten schien der tomas®-pin eine leichte Herabsetzung der Zellvitalität zu verursachen, wogegen die LOMAS-Schraube mit Unebenheiten und Abweichungen der Legierung an der Oberfläche die beste Biokompatibilität in vitro zeigte. Es scheint also keinen negativen Einfluss einer mikroskopisch erkennbaren Oberflächenvergrößerung auf die Biokompatibilität zu geben. Die Studienergebnisse lassen Unterschiede in der Biokompatibilität kieferorthopädischer Minischrauben vermuten, doch aufgrund der sehr geringen Abweichungen zu den Negativkontrollen ist keines der getesteten Produkte als zytotoxisch zu bezeichnen. Um definitive Aussagen zu Vorteilen eines Produktes gegenüber einem anderen zu treffen, müssen weitere in-vitro- und in-vivo-Studien folgen.

6. Summary

Background & aims:

Mini screws were developed during the last decades to provide a skeletal anchorage for orthodontic treatments. Although there are various clinical surveys, the reasons of failure (about 15% within 6-12 months) have not been revealed completely. The aim of this study was to analyse differences in surface structure and alloy as well as their effects on the *in vitro* biocompatibility.

Material & methods:

Experiments were performed with four different mini screws of comparable size: tomas®-pin (Dentaurum), OrthoEasy® pin (Forestadent®), Dual Top™ (Jeil Medical/Promedia) and LOMAS screw (Mondeal®). A scanning electron microscope (SEM) with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) was used to detect differences between the four products concerning their surface structure and the alloy composition. For the assessment of cytotoxicity 48 h MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazolium bromide) assays and agar overlay assays with neutral red dye were performed.

Results:

The SEM and EDX data showed slight surface modifications in some screws. There was a slightly reduced viability in some of the MTT assays after contact with all products but the LOMAS screw. The tomas®-pin, OrthoEasy® pin and Dual Top™ led to slight decolourations of osteoblast like cells in the agar overlay assays.

Discussion:

The results presume differences in the biocompatibility and composition of tested mini screws. Due to the slight differences obtained in cytotoxicity assays with respect to negative controls none of the products should be classified as cytotoxic.

7. Literaturverzeichnis

Akasaka, T., Yokoyama, A., Matsuoka, M., Hashimoto, T., Abe, S., Uo, M., Watari, F. (2009): Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2) to carbon nanotube sheets. Biomed Mater Eng, 19, 147-153

Altwater, T., Hendrich, C., Noth, U., Rader, C. P., Stach, R., Schutze, N., Eulert, J., Thull, R. (2000): Zytotoxizitätsuntersuchung von hochgoldhaltigen Degutan-Oberflächen unterschiedlicher Rauigkeit mit Fibroblasten (BALB 3T3) und Osteoblasten (hFOB 1.19). Biomed Tech (Berl), 45, 238-242

American Society for Testing and Materials (2008): ASTM F136 - 08e1 Standard specification for wrought titanium-6 aluminum-4 vanadium ELI (extra low interstitial) alloy for surgical implant applications. ASTM International, West Conshohocken, PA, USA

Angelieri, F., Almeida, R. R., Almeida, M. R., Fuziy, A. (2006): Dentoalveolar and skeletal changes associated with the pendulum appliance followed by fixed orthodontic treatment. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 129, 520-527

Berens, A., Wiechmann, D. (2006): Mini- und Mikroschrauben als skelettale Verankerung in der Kieferorthopädie - Optimierung des klinischen Vorgehens. Kieferorthopädie, 20, 167-174

Berens, A., Rüdiger, J., Wiechmann, D. (2005): Erfolgsraten von Mini- und Mikroschrauben zur skelettalen Verankerung in der Kieferorthopädie. Inf Orthod Kieferorthop, 37, 283-287

Bernas, T., Dobrucki, J. (2002): Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1 and NAO mitochondrial fluorescent probes. Cytometry, 47, 236-242

Borenfreund, E., Puerner, J. A. (1984): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HDT/NR-90). J Tissue Cult, 9, 7-9

Büchter, A., Wiechmann, D., Koerdt, S., Wiesmann, H. P., Piffko, J., Meyer, U. (2005): Load-related implant reaction of mini-implants used for orthodontic anchorage. Clin Oral Implants Res, 16, 473-479

Chaison, E. T., Liu, X., Tuncay, O. C. (2011): The quality of treatment in the adult orthodontic patient as judged by orthodontists and measured by the Objective Grading System. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 139, S69-S75

Chen, Z. X., Takao, Y., Wang, W. X., Matsubara, T., Ren, L. M. (2009): Surface characteristics and in vitro biocompatibility of titanium anodized in a phosphoric acid solution at different voltages. Biomed Mater, 4, 065003

Colliex, C. (2008): Elektronenmikroskopie - Eine anwendungsbezogene Einführung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

Craig, R. G., Hanks, C. T. (1988): Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. J Oral Pathol, 17, 341-347

Creekmore, T. D., Eklund, M. K. (1983): The possibility of skeletal anchorage. J Clin Orthod, 17, 266-269

Crismani, A. G., Bertl, M. H., Celar, A. G., Bantleon, H. P., Burstone, C. J. (2010): Miniscrews in orthodontic treatment: review and analysis of published clinical trials. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 137, 108-113

Cureton, S. L., Regennitter, F. J., Yancey, J. M. (1993): Clinical versus quantitative assessment of headgear compliance. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 104, 277-284

Deutsches Institut für Normung e. V. (1996): DIN ISO 5832-3 Chirurgische Implantate - Metallische Werkstoffe - Teil 3: Titan-Aluminium-6-Vanadium-4-Knetlegierung. Beuth Verlag GmbH, Berlin

Deutsches Institut für Normung e. V. (2001): DIN EN ISO 10271 Dentale metallische Werkstoffe - Korrosionsprüfverfahren. Beuth Verlag GmbH, Berlin

Deutsches Institut für Normung e. V. (2009): DIN EN ISO 10993-5 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität. Beuth Verlag, Berlin

Di Virgilio, A. L., Reigosa, M., Arnal, P. M., Fernandez Lorenzo de Mele, M. (2010): Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J Hazard Mater*, 177, 711-718

Eggert, F. (2005): Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse mit dem EDX im Rasterelektronenmikroskop - Ein Handbuch für die Praxis. Books on Demand GmbH, Norderstedt

Elshahawy, W. M., Watanabe, I., Kramer, P. (2009): In vitro cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials. *Dent Mater*, 25, 1551-1555

Es-Souni, M., Es-Souni, M., Fischer-Brandies, H. (2002): On the properties of two binary NiTi shape memory alloys. Effects of surface finish on the corrosion behaviour and in vitro biocompatibility. *Biomaterials*, 23, 2887-2894

Es-Souni, M., Fischer-Brandies, H., Es-Souni, M. (2003): On the in vitro biocompatibility of Elgiloy, a Co-based alloy, compared to two titanium alloys. *J Orofac Orthop*, 64, 16-26

Faria, A. C., Rosa, A. L., Rodrigues, R. C., Ribeiro, R. F. (2008): In vitro cytotoxicity of dental alloys and cpTi obtained by casting. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 85, 504-508

Faria, A. C., Rodrigues, R. C., Antunes, R. P., de Mattos Mda, G., Rosa, A. L., Ribeiro, R. F. (2009): Effect of temperature variation on the cytotoxicity of cast dental alloys and commercially pure titanium. *J Appl Oral Sci*, 17, 421-426

Fassina, L., Saino, E., Visai, L., De Angelis, M. G., Benazzo, F., Magenes, G. (2007): Enhanced in vitro culture of human SAOS-2 osteoblasts on a sand-blasted titanium surface modified with plastic deformation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 6411-6414

Fini, M., Cigada, A., Rondelli, G., Chiesa, R., Giardino, R., Giavaresi, G., Nicoli Aldini, N., Torricelli, P., Vicentini, B. (1999): In vitro and in vivo behaviour of Ca- and P-enriched anodized titanium. *Biomaterials*, 20, 1587-1594

Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006): In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 160, 171-177

Fritz, U., Ehmer, A., Diedrich, P. (2004): Klinische Eignung von Mikrotitanschrauben zur orthodontischen Verankerung - erste Erfahrungen. *J Orofac Orthop*, 64, 410-418

Gainsforth, B. L., Highley, L. B. (1945): A study of orthodontic anchorage possibilities in basal bone. *Am J Orthod Oral Surg*, 31, 406-417

Gallardo-Moreno, A. M., Pacha-Olivenza, M. A., Saldana, L., Perez-Giraldo, C., Bruque, J. M., Vilaboa, N., Gonzalez-Martin, M. L. (2009): In vitro biocompatibility and bacterial adhesion of physico-chemically modified Ti6Al4V surface by means of UV irradiation. *Acta Biomater*, 5, 181-192

Germann, L., Banerjee, D., Guédou, J. Y., Strudel, J. L. (2005): Effect of composition on the mechanical properties of newly developed Ti₂AlNb-based titanium aluminide. *Intermetallics*, 13, 920-924

Giordano, C., Sandrini, E., Del Curto, B., Signorelli, E., Rondelli, G., Di Silvio, L. (2004): Titanium for osteointegration: comparison between a novel biomimetic treatment and commercially exploited surfaces. *J Appl Biomater Biomech*, 2, 35-44

Harris, L. G., Patterson, L. M., Bacon, C., Gwynn, I., Richards, R. G. (2005): Assessment of the cytocompatibility of different coated titanium surfaces to fibroblasts and osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*, 73, 12-20

Hempel, U., Hefti, T., Kalbacova, M., Wolf-Brandstetter, C., Dieter, P., Schlottig, F. (2010): Response of osteoblast-like SAOS-2 cells to zirconia ceramics with different surface topographies. *Clin Oral Implants Res*, 21, 174-181

Hoffmann, B., Kokott, A., Shafranska, O., Detsch, R., Winter, S., Eisenbarth, E., Peters, K., Breme, J., Kirkpatrick, C. J., Ziegler, G. (2005): Einfluss einer TiO₂-beschichtung auf Biokompatibilität, Korrosions- und Auslaugverhalten verschiedener Implantatlegierungen. *Biomed Tech (Berl)*, 50, 320-329

Hornbogen, E., Skrotzki, B. (2009a): Analytische Elektronenmikroskopie. In: Mikro- und Nanoskopie der Werkstoffe, 220, Springer-Verlag, Heidelberg

Hornbogen, E., Skrotzki, B. (2009b): Rasterelektronenmikroskop. In: Mikro- und Nanoskopie der Werkstoffe, 24-25, Springer-Verlag, Heidelberg

Huhtala, A., Alajuuma, P., Bungalassi, S., Chetoni, P., Diehl, H., Engelke, M., Marselos, M., Monti, D., Pappas, P., Saettone, M. F., Salminen, L., Sotiropoulou, M., Tahti, H., Uusitalo, H., Zorn-Kruppa, M. (2003): A collaborative evaluation of the cytotoxicity of two surfactants by using the human corneal epithelial cell line and the WST-1 test. J Ocul Pharmacol Ther, 19, 11-21

Ishizawa, H., Fujino, M., Ogino, M. (1995): Mechanical and histological investigation of hydrothermally treated and untreated anodic titanium oxide films containing Ca and P. J Biomed Mater Res, 29, 1459-1468

Jakobsen, S. S., Larsen, A., Stoltenberg, M., Bruun, J. M., Soballe, K. (2007): Effects of as-cast and wrought Cobalt-Chrome-Molybdenum and Titanium-Aluminium-Vanadium alloys on cytokine gene expression and protein secretion in J774A.1 macrophages. Eur Cell Mater, 14, 45-54; discussion 54-45

Johnson, H. J., Northup, S. J., Seagraves, P. A., Garvin, P. J., Wallin, R. F. (1983): Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. I. Comparative test system sensitivity. J Biomed Mater Res, 17, 571-586

Jung, R. E., Pjetursson, B. E., Glauser, R., Zembic, A., Zwahlen, M., Lang, N. P. (2008): A systematic review of the 5-year survival and complication rates of implant-supported single crowns. Clin Oral Implants Res, 19, 119-130

Khosroshahi, M. E., Mahmoodi, M., Saeedinasab, H. (2009): In vitro and in vivo studies of osteoblast cell response to a titanium-6 aluminium-4 vanadium surface modified by neodymium:yttrium-aluminium-garnet laser and silicon carbide paper. Lasers Med Sci, 24, 925-939

Kinzinger, G. S., Eren, M., Diedrich, P. R. (2008): Treatment effects of intraoral appliances with conventional anchorage designs for non-compliance maxillary molar distalization: a literature review. Eur J Orthod, 30, 558-571

Klinger, A., Tadir, A., Halabi, A., Shapira, L. (2011): The effect of surface processing of titanium implants on the behavior of human osteoblast-like Saos-2 cells. Clin Implant Dent Relat Res, 13, 64-70

Kneuertz, P. J. A. (2009): Biomechanischer in-vitro-Vergleich von vier Minischrauben zur skelettalen Verankerung im Kiefer- und Gesichtsbereich. Med. Diss., Klinik und Poliklinik für zahnärztliche Chirurgie und Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Köln

Koike, M., Lockwood, P. E., Wataha, J. C., Okabe, T. (2007): Initial cytotoxicity of novel titanium alloys. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 83, 327-331

Kuroda, S., Sugawara, Y., Deguchi, T., Kyung, H.-M., Takano-Yamamoto, T. (2007a): Clinical use of miniscrew implants as orthodontic anchorage: success rates and postoperative discomfort. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 131, 9-15

Kuroda, S., Yamada, K., Deguchi, T., Kyung, H. M., Takano-Yamamoto, T. (2009): Class II malocclusion treated with miniscrew anchorage: comparison with traditional orthodontic mechanics outcomes. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 135, 302-309

Kuroda, S., Yamada, K., Deguchi, T., Hashimoto, T., Kyung, H.-M., Takano-Yamamoto, T. (2007b): Root proximity is a major factor for screw failure in orthodontic anchorage. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 131, 68-73

Lee, Y. M., Lee, E. J., Yee, S. T., Kim, B. I., Choe, E. S., Cho, H. W. (2008): In vivo and in vitro response to electrochemically anodized Ti-6Al-4V alloy. J Mater Sci Mater Med, 19, 1851-1859

Liu, X., Chu, P. K., Ding, C. (2004): Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. Materials Science and Engineering: R: Reports, 47, 49-121

Louis, K. S., Siegel, A. C. (2011): Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. Methods Mol Biol, 740, 7-12

McKay, G. C., Macnair, R., MacDonald, C., Grant, M. H. (1996): Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. *Biomaterials*, 17, 1339-1344

Miyawaki, S., Koyama, I., Inoue, M., Mishima, K., Sugahara, T., Takano-Yamamoto, T. (2003): Factors associated with the stability of titanium screws placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 124, 373-378

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63

Motoyoshi, M., Matsuoka, M., Shimizu, N. (2007): Application of orthodontic mini-implants in adolescents. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36, 695-699

Nandy, T. K., Mishra, R. S., Gogia, A. K., Banerjee, D. (1995): THE EFFECT OF ALUMINUM ON THE CREEP-BEHAVIOR OF TITANIUM ALUMINIDE ALLOYS. *Scr. Metall. Materialia*, 32, 851-856

Nemes, Z., Dietz, R., Luth, J. B., Gomba, S., Hackenthal, E., Gross, F. (1979): The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*, 35, 1475-1476

Okazaki, Y., Rao, S., Ito, Y., Tateishi, T. (1998): Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. *Biomaterials*, 19, 1197-1215

Osathanon, T., Bessinyowong, K., Arksornnukit, M., Takahashi, H., Pavasant, P. (2011): Human osteoblast-like cell spreading and proliferation on Ti-6Al-7Nb surfaces of varying roughness. *J Oral Sci*, 53, 23-30

Park, H. S., Jeong, S. H., Kwon, O. W. (2006): Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 130, 18-25

Pjetursson, B. E., Tan, K., Lang, N. P., Bragger, U., Egger, M., Zwahlen, M. (2004): A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures

(FPDs) after an observation period of at least 5 years. Clin Oral Implants Res, 15, 625-642

Reicheneder, C., Rottner, K., Bokan, I., Mai, R., Lauer, G., Richter, G., Gedrange, T., Proff, P. (2008): Mechanical loading of orthodontic miniscrews - significance and problems: an experimental study. Biomed Tech (Berl), 53, 242-245

Romanos, G. E., Toh, C. G., Siar, C. H., Swaminathan, D. (2002): Histologic and histomorphometric evaluation of peri-implant bone subjected to immediate loading: an experimental study with Macaca fascicularis. Int J Oral Maxillofac Implants, 17, 44-51

Sarma, K. D., Ray, D., Antony, A. (2000): Improved sensitivity of trypan blue dye exclusion assay with Ni²⁺ or Co²⁺ salts. Cytotechnology, 32, 93-95

Saw, T. Y., Cao, T., Yap, A. U. J., Lee Ng, M. M. (2005): Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. Toxicol In Vitro, 19, 145-154

Scharnweber, D., Beutner, R., Rossler, S., Worch, H. (2002): Electrochemical behavior of titanium-based materials - are there relations to biocompatibility? J Mater Sci Mater Med, 13, 1215-1220

Schätzle, M., Männchen, R., Zwahlen, M., Lang, N. P. (2009): Survival and failure rates of orthodontic temporary anchorage devices: a systematic review. Clin Oral Implants Res, 20, 1351-1359

Schiff, N., Grosogeat, B., Lissac, M., Dalard, F. (2002): Influence of fluoride content and pH on the corrosion resistance of titanium and its alloys. Biomaterials, 23, 1995-2002

Sjögren, G., Sletten, G., Dahl, J. E. (2000): Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. J Prosthet Dent, 84, 229-236

Soud-Mensi, G., Moukha, S., Mobio, T. A., Maaroufi, K., Creppy, E. E. (2008): The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicon*, 51, 1338-1344

Strietzel, R., Hosch, A., Kalbfleisch, H., Buch, D. (1998): In vitro corrosion of titanium. *Biomaterials*, 19, 1495-1499

Takaki, T., Tamura, N., Yamamoto, M., Takano, N., Shibahara, T., Yasumura, T., Nishii, Y., Sueishi, K. (2010): Clinical study of temporary anchorage devices for orthodontic treatment - stability of micro/mini-screws and mini-plates: experience with 455 cases. *The Bulletin of Tokyo Dental College*. 51, 151-163

Velasco-Ortega, E., Jos, A., Camean, A. M., Pato-Mourelo, J., Segura-Egea, J. J. (2010): In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology. *Mutat Res*, 702, 17-23

Velten, D., Biehl, V., Aubertin, F., Valeske, B., Possart, W., Breme, J. (2002): Preparation of TiO₂ layers on cp-Ti and Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation and by sol-gel coating techniques and their characterization. *J Biomed Mater Res*, 59, 18-28

Wataha, J. C., Hanks, C. T., Sun, Z. (1994): Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater*, 10, 156-161

Wataha, J. C., Lockwood, P. E., Nelson, S. K., Rakich, D. (1999): In vitro cytotoxicity of dental casting alloys over 8 months. *J Oral Rehabil*, 26, 379-387

Watanabe, I., Wataha, J. C., Lockwood, P. E., Shimizu, H., Cai, Z., Okabe, T. (2004): Cytotoxicity of commercial and novel binary titanium alloys with and without a surface-reaction layer. *J Oral Rehabil*, 31, 185-189

Widmer, M. (1998): Kontrolle der Oberflächenqualität von anodisierten Titan-Implantaten mittels Reflexionsspektroskopie. Diplomarbeit, Department Werkstoffe, Oberflächentechnik, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich

Woodman, J. L., Jacobs, J. J., Galante, J. O., Urban, R. M. (1984): Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study. *J Orthop Res*, 1, 421-430

Zhu, X., Ong, J. L., Kim, S., Kim, K. (2002): Surface characteristics and structure of anodic oxide films containing Ca and P on a titanium implant material. *J Biomed Mater Res*, 60, 333-338

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Helge Fischer-Brandies für die Bereitstellung des Themas und der Labore und Materialien. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Thorsten Sommer für die Unterstützung bei der Erarbeitung und Durchführung der Versuche. Frau Dr. Martha Es-Souni möchte ich für die Betreuung im weiteren Verlauf der Dissertation und die Unterstützung bei der Veröffentlichung danken.

Bei der Arbeit im Labor hat mir Frau Martina Schneeberg und am Rasterelektronenmikroskop Herr Frank Lehmann sehr geholfen, denen ich auf diesem Wege ebenfalls herzlich danken möchte.

Für die Bereitstellung der Minischrauben und Informationen dazu möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken: Nina Smolarek und Kurt Stolp von Dentaforum (Ispringen, Deutschland), Günter Mauch von Mondeal® Medical Systems GmbH (Mühlheim an der Donau, Deutschland), Michael Fies, Holger Raschke und Axel Fischer von Forestadent® (Pforzheim, Deutschland) und Hartwig Ahnfeldt von Promedia Medizintechnik (Siegen, Deutschland).

Dem Direktorium des Anatomischen Instituts der CAU Kiel, insbesondere Herrn Prof. Ralf Lucius, danke ich für die große Unterstützung während des Schreibens und meinen dortigen Kollegen für wiederholtes Korrekturlesen und viele hilfreiche Tipps. Hier sind vor allem Frau Dr. Kirsten Hattermann, Frau Dr. Ines Hellwig, Herr Marek Struck und Herr Dr. Falk Birkenfeld zu nennen, die aus sehr unterschiedlichen Perspektiven Anregungen gegeben und damit viel zur Vervollständigung der Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern danke ich besonders dafür, dass sie mich immer unterstützt haben und mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht haben. Martin Finke und Andy Jöhnke danke ich für hilfreiche Tipps ohne medizinischen Hintergrund und mentale Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Hannah Finke
Preußerstraße 18
24105 Kiel
Geburtstag: 05.05.1985
Geburtsort: Henstedt-Ulzburg
Staatsbürgerschaft: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

08/1992-12/1998: Freie Waldorfschule, Lübeck
01/1999-01/2002: Gymnasium am Mühlenberg, Bad Schwartau
02/2002-05/2005: Johanneum zu Lübeck
31.05.2005: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Zahnmedizin:

04.10.2005: Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
15.09.2006: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
31.03.2008: Zahnärztliche Vorprüfung
01/2009-02/2010: Durchführung der Versuche für die Dissertation
09.12.2010: Zahnärztliche Prüfung
10.12.2010: Zahnärztliche Approbation

Auslandsaufenthalte:

06/2005-10/2005: Praktikum auf einer Farm und Jugendherberge in Húsey, Egilsstaðir, Island
07/2009-09/2009: Zahnmedizinische Famulatur in Huaraz und Cusco, Peru

Berufstätigkeit:

01/2011-12/2011: wissenschaftliche Mitarbeiterin am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Seit 12/2011: Assistenz Zahnärztin in der Praxis M. Kräling, Strande

10. Veröffentlichungen

Poster

28. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg (2011):

Finke, H., Fischer-Brandies, H., Es-Souni, M.

Assessment of in vitro biocompatibility of orthodontic mini screws in human gingival fibroblasts and SAOS-2 cell cultures

11. Erklärung

Ich erkläre, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.